

Beeinflussung von Zellphysiologie und mitochondrialer Funktion durch Alzheimer Demenz-assoziiertes Amyloides- β Peptid



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte
Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Biochem. Victoria Decker
aus Dernbach

Referent: Prof. Dr. Norbert A. Dencher

Korreferent: PD Dr. Tobias Meckel

Tag der Einreichung: 06. April 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 2016

Darmstadt 2016



Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Norbert A. Dencher in der Zeit von März 2012 bis April 2016 am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.



Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits auf Fachtagungen präsentiert:

- 06/2015 **V. Decker**, S. Kern, T. Meckel, N. A. Dencher
Mitochondrial membranes are the target of Alzheimer's disease triggering amyloid- β 1-42 ($A\beta_{1-42}$) peptide (Poster 95)
Mechanisms of Neurodegeneration, EMBL, Heidelberg
- 03/2015 **V. Decker**, T. Meckel, N. A. Dencher:
Interaction of Alzheimer's disease triggering amyloid- β peptide with mammalian mitochondria (Poster P9)
12. German Peptide Symposium, TU Darmstadt
- 10/2013 **V. Decker**, S. Eckes, N. A. Dencher:
Localization of amyloid-beta 1-42 ($A\beta_{1-42}$) peptides in cells and their influence on mitochondrial function (Pecha Kucha Talk PKV24 und Poster PKV24)
Molecular Life Sciences 2013, Goethe Universität, Frankfurt
- 04/2013 L. Cavlovic, **V. Decker**, M. Azakli, C. Kern, S. Kern, N. A. Dencher:
Functional and proteomic comparison of rat oligodendroglia cell line OLN-93 and human neuroblastoma cell line SH-SY5Y as model systems for the influence of X-ray radiation and amyloid-beta peptides
(DOI®: 10.3288/contoo.paper.2593)
64. Mosbacher Kolloquium, Alte Mälzerei, Mosbach

Publikationen

- 2016 Manuskript in Präparation (geplante Veröffentlichung in PNAS)
V. Decker, S. Kern, T. Meckel, N. A. Dencher:
Alzheimer's disease $A\beta_{1-42}$ oligomers target endosomal and mitochondrial membranes
- 2016 Manuskript in Präparation (geplante Veröffentlichung in J. Proteome Res.)
M. Kratochwil, S.-H. Marx, **V. Decker**, S. Hartwig, K. Kuter, L. Cavlovic, K. Ossowska, S. Lehr, N. A. Dencher:
Identification of conserved mitochondrial proteins of tissues from several mammalian hearts and rat brain areas as well as cell culture samples: proteome analysis after protein separation by 2D-BN/SDS-PAGE





Imagine not being able to recognize your best friend.



Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1.1 Beeinflussung von Zellphysiologie und mitochondrialer Funktion durch Alzheimer Demenz-assoziiertes Amyloides- β Peptid.....	1
1.2 Alzheimer's disease triggering amyloid- β peptide alters cell physiology and mitochondrial function	4
2 Einleitung.....	7
2.1 Demenzerkrankungen.....	7
2.2 Die Alzheimer Demenz	9
2.3 Das amyloide- β Peptid (A β).....	11
2.3.1 Entstehung von A β Peptiden.....	11
2.3.2 Das A β ₁₋₄₂ Peptid.....	13
2.3.3 Neurotoxizität verschiedener A β Spezies	14
2.4 Zusammenspiel von A β Peptiden und tau Proteinen.....	16
2.5 Mitochondrien	17
2.5.1 Die oxidative Phosphorylierung.....	17
2.5.2 Das mitochondriale Membranpotenzial	18
2.5.3 Reaktive Sauerstoffspezies	19
2.5.4 Apoptose	20
2.6 Die Rolle der Mitochondrien bei Alzheimer Demenz.....	21
2.7 Motivation	22
3 Materialien	25
3.1 Geräteliste.....	25
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	28
3.3 Zelllinien	30
3.3.1 OLN-93	30
3.3.2 SH-SY5Y	31
3.4 Chemikalienliste.....	31
3.5 Zellkulturbedarf.....	35
3.6 Proteinmassenstandards.....	35
3.7 Peptide	35
3.8 Plasmid	36
3.9 Antikörper	36
3.9.1 Primäre Antikörper	36
3.9.2 Sekundäre Antikörper	36
3.10 Gase.....	36
3.11 Kits	37
3.12 Puffer und Lösungen	37
3.13 Stammlösungen	40
3.14 Medien und Puffer für die Zellkultur	41
3.15 Software.....	42

4 Methoden.....	43
4.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien.....	43
4.2 Subkultivierung adhärenter Zelllinien	43
4.3 Bestimmung der Zellzahl.....	43
4.4 Kryokonservierung	44
4.5 Bestimmung der Populationsverdopplungszeit	45
4.6 Generierung einer stabilen Zelllinie	45
4.7 Disaggregation von A β Peptiden	46
4.8 Applikation von A β Peptiden	46
4.9 Nachweis von extern applizierten A β Peptiden.....	46
4.10 Zellviabilitätstests	47
4.10.1 Neutralrot-Aufnahmetest.....	47
4.10.2 AlamarBlue® Test	47
4.10.3 Annexin V/Propidiumiodid Test	48
4.11 Nachweis Reaktiver Sauerstoffspezies	49
4.12 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials.....	50
4.12.1 JC-1 Test	50
4.12.2 MitoTracker® Test.....	51
4.13 Durchflusszytometrie.....	51
4.14 Konfokalmikroskopie	53
4.15 Generierung von Zelllysaten.....	55
4.16 Isolierung von Mitochondrien	55
4.16.1 Isolierung von Mitochondrien für gelbasierte Methoden.....	55
4.16.2 Isolierung von Mitochondrien für in-Lösung Aktivitätstests	56
4.17 Proteinbestimmung nach Bradford	56
4.18 Bestimmung der Adenosintriphosphat (ATP) Konzentration	57
4.19 Fluoreszenzanisotropie	58
4.20 Solubilisierung von Membranproteinen	59
4.20.1 Solubilisierung von Membranproteinen aus Rinderherzmitochondrien (BHM).....	60
4.20.2 Solubilisierung von Membranproteinen aus Zellkulturen.....	60
4.21 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	61
4.21.1 SDS-PAGE.....	61
4.21.2 Blau-native (BN) PAGE.....	63
4.21.3 2D-BN/SDS-PAGE.....	65
4.22 Aktivitätstests für OxPhos Komplexe.....	66
4.22.1 In-Gel Aktivitätstests.....	66
4.22.1.1 Quantitativer in-Gel Aktivitätstest für OxPhos Komplex I bzw. IV	67
4.22.1.2 Qualitativer in-Gel Hydrolyseaktivitätstest für OxPhos Komplex V	70
4.22.2 In-Lösung Aktivitätstests	71
4.22.2.1 Quantitativer in-Lösung Aktivitätstest für OxPhos Komplex I.....	72
4.22.2.2 Quantitativer in-Lösung Aktivitätstest für OxPhos Komplex II	73
4.22.2.3 Quantitativer in-Lösung Aktivitätstest für OxPhos Komplex IV	74
4.22.2.4 Quantitativer in-Lösung Aktivitätstest für Citrat-Synthase.....	74
4.22.3 Aktivitätstest mit immobilisiertem OxPhos Komplex I.....	75
4.23 Western Blot	76

4.24	Regeneration einer Nitrozellulosemembran.....	78
4.25	OxyBlot™	78
4.26	Proteinfärbungen	79
4.26.1	Kolloidale Coomassiefärbung.....	79
4.26.2	Silberfärbung.....	80
4.26.3	SYPRO® Ruby Färbung.....	80
4.26.4	Ponceau S Färbung	81
4.27	Quantitative Proteomanalyse.....	81
4.28	Massenspektrometrie und Peptidmassenfingerprint	83
4.29	Statistik.....	85
5	Ergebnisse und Diskussion.....	86
5.1	Ausgangssituation	86
5.2	Charakterisierung von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen	87
5.2.1	Wachstumsverhalten.....	87
5.2.2	Optimierung gelbasierter Methoden für Zellkulturproben.....	90
5.2.3	Proteomanalyse	95
5.3	Einfluss von Aβ ₁₋₄₂ Mono- und Oligomeren auf OLN-93 und SH-SY5Y Zellen ...	119
5.3.1	Aβ ₁₋₄₂ wurde in Mitochondrien und anderen Zellkompartimenten lokalisiert	119
5.3.2	Aβ ₁₋₄₂ zeigte keine direkte Wirkung auf die Zellviabilität.....	123
5.3.3	Aβ ₁₋₄₂ generierte oxidativen Stress.....	128
5.3.4	Aβ ₁₋₄₂ beeinträchtigte den mitochondrialen Energiestoffwechsel.....	132
5.3.5	Aβ ₁₋₄₂ beeinflusste die mitochondrialen Membranen.....	149
5.3.6	Aβ ₁₋₄₂ induzierte Änderungen des Proteoms.....	158
6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	170
7	Anhang.....	179
7.1	Aminosäuresequenz des humanen amyloiden Vorläufer-proteins APP.....	179
7.2	Vektorkarte von pTagBFP-mito	181
7.3	Struktur von Fluoresceinisothiocyanat und die Kopplung an Aβ ₁₋₄₂	181
7.4	BN Western Blots.....	182
7.4.1	OLN-93 und SH-SY5Y.....	182
7.4.2	HeLa.....	184
7.5	2D Western Blots	184
7.5.1	BHM	185
7.5.2	OLN-93	188
7.5.3	SH-SY5Y	191
7.6	Quantitative Proteomanalyse: OLN-93 vs. SH-SY5Y	194
7.7	Intrazelluläre Lokalisation von Aβ ₁₋₄₂ Peptiden.....	196
7.8	Identifikation von Proteinmodifikationen	198
7.9	Aktivität von Atmungskettenkomplexen.....	199
7.10	Ermittlung des mitochondrialen Membranpotenzials	201
7.11	"Fluidität" der Mitochondrienmembran	202
7.12	Quantitative Proteomanalyse: unbehandelt vs. Aβ-behandelt.....	203

8 Verzeichnisse.....	207
8.1 Literaturverzeichnis	207
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	227
8.3 Tabellenverzeichnis	230
8.4 Abkürzungsverzeichnis.....	231
8.5 Einheitenverzeichnis	236
9 Danksagung.....	237
Lebenslauf.....	238
Eidesstattliche Erklärungen.....	240

1 Zusammenfassung

1.1 Beeinflussung von Zellphysiologie und mitochondrialer Funktion durch Alzheimer Demenz-assoziiertes Amyloides- β Peptid

Bei Alzheimer Demenz (AD), der häufigsten Form der Demenzerkrankungen, gehen im Krankheitsverlauf durch langsam fortschreitende Neurodegeneration kognitive Funktionen unwiederbringlich verloren. Die Entwicklung von Präventionsmöglichkeiten sowie Therapien sind dringend erforderlich, weil die stetig wachsende Anzahl an Alzheimerpatienten mit erheblichen finanziellen und sozialen Belastungen für die Gesellschaft einhergehen.

Die posttranslational aus dem amyloiden Vorläuferprotein APP, ein Typ I Transmembranprotein, generierten A β Peptide nehmen eine wichtige Funktion bei der AD Pathogenese ein [1, 2]. Jüngste Erkenntnisse benennen intraneuronal vorkommende A β Mono- und Oligomere als pathogene Formen des Peptids (Oligomer-Hypothese) [3-7]. Die Isoform A β_{1-42} scheint dabei am toxischsten zu sein [8, 9]. Von der A β Neurotoxizität sind vornehmlich Synapsen betroffen [3]. Da die in den Synapsen konzentrierten Mitochondrien bereits in der sehr frühen Phase der AD Pathogenese Dysfunktionen aufweisen [10], fokussierte sich die vorliegende Studie auf Mitochondrien, um deren signifikante Funktion in der Anfangsphase der AD Pathogenese zu charakterisieren.

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y und die Ratten-Oligodendrozytenzelllinie OLN-93 mit 2,0 μ M disaggregiertem A β_{1-42} Peptid für 24 h behandelt. Das extern applizierte Peptid wurde intrazellulär lokalisiert. Es wurden die Auswirkungen des A β_{1-42} Peptids auf die Zellviabilität, den oxidativen Stress, den Energiestoffwechsel, die mitochondrialen Membranen sowie das Proteom analysiert.

A β_{1-42} Peptide wurden mit Trifluoressigsäure disaggregiert, woraus Mono- bis Heptamere resultierten. Fluoreszenzmarkierte A β_{1-42} Peptide wurden nach 5 h Inkubation in späten Endosomen mittels Konfokalmikroskopie lokalisiert und nach 16 h in Mitochondrien. OLN-93 Zellen schienen eine größere Menge an A β_{1-42} Peptiden in die Mitochondrien aufzunehmen als SH-SY5Y Zellen. Aufgrund der Lokalisation in späten Endosomen nach kurzer Inkubationszeit wird postuliert, dass die Aufnahme der extern applizierten Peptide über Endozytose erfolgt.

Auf die Zellviabilität von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen, die mittels dem alamarBlue® Test und dem Neutralrot-Aufnahmetest im 96-*well* Format untersucht wurde, hatten A β_{1-42} Peptide keinen signifikanten Einfluss. Kennzeichen von frühapoptotischen Zellen ist die Verlagerung von Phosphatidylserin auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran, wo es von Annexin V gebunden werden kann. Propidiumiodid interkaliert in die DNA nach Verlust der Plasmamembranintegrität, charakteristisch für spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen. Durchflusszytometrische Analysen nach FITC Annexin V- und Propidiumiodidzugabe zeigten in beiden

Zelllinien keine Veränderung der Anzahl apoptotischer/nekrotischer Zellen durch A β ₁₋₄₂ Peptide.

Das zellpermeable 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat wird intrazellulär durch Esterasen gespalten und in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch Peroxidasen zum fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert, wodurch es als Indikator für Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gilt. In A β ₁₋₄₂ behandelten Proben wurde über die Messung der DCF-Fluoreszenz im 96-well Format eine große Zunahme (> 120%) der zellulären ROS Menge im Vergleich zu unbehandelten Proben gefunden. A β ₁₋₄₂ führt somit zu einer vermehrten Generierung von ROS und/oder zu einer Störung der Antioxidationsysteme. ROS induzieren u.a. Proteinoxidationen, die in Aktivitätsminderungen der betroffenen Proteine resultieren können. Mitochondriale Proteinoxidationen wurden über die Quantifizierung von OxyBlots™, die Proteincarbonylierungen detektieren, ermittelt. A β ₁₋₄₂ Behandlung resultierte in einem geringen Anstieg der mitochondrialen Proteincarbonylierung, der in Bezug zu bisherigen Untersuchungen der zellulären Proteincarbonylierung gebracht wurde.

Der Einfluss von A β ₁₋₄₂ Peptiden auf den Energiestoffwechsels wurde durch die Analyse der spezifischen Aktivitäten von Atmungskettenkomplexen sowie der zellulären ATP Konzentration ermittelt. Die spezifischen Aktivitäten von NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (CI), Succinat Dehydrogenase (CII) und Cytochrom-c-Oxidase (CIV) wurden spektrophotometrisch an isolierten Mitochondrien (CI) bzw. Zelllysaten (CII und CIV) bestimmt. Die spezifische CI Aktivität verringerte sich in beiden Zelllinien durch A β ₁₋₄₂, wohingegen die spezifische CIV Aktivität zunahm. A β ₁₋₄₂ Peptide hatten keinen Einfluss auf die spezifische CII Aktivität in OLN-93 Zellen. In SH-SY5Y Zellen wurde eine A β ₁₋₄₂-vermittelte Abnahme der CII Aktivität beobachtet. Durch die Aktivitätsminderung an CI und CII könnten weitere ROS generiert werden. Die Aktivitätszunahme von CIV lässt sich durch eine gesteigerte Proteinmenge und/oder durch eine vermehrte Assemblierung zu Superkomplexen erklären. Die luminesmetrische Bestimmung der zellulären ATP Konzentration über die ATP-vermittelte oxidative Decarboxylierung von D-Luciferin durch Luciferase resultierte in einer A β ₁₋₄₂-vermittelten Verringerung der zellulären ATP Konzentration. A β ₁₋₄₂ Peptide führen demnach zu einer geringeren ATP Synthese und/oder zu einem größeren ATP Verbrauch.

Die mitochondrialen Membranen wurden durch A β ₁₋₄₂ beeinflusst. A β ₁₋₄₂ Peptide führten zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP), das über reduzierte MitoTracker® am Durchflusszytometer ermittelt wurde. Dieser Befund konnte durch die gemessene Aktivitätsminderung von CI erklärt werden. A β ₁₋₄₂-induzierte Kanäle in der Mitochondrienmembran könnten ebenfalls ursächlich für die Depolarisation des MMP sein. Anhand der *steady-state* Fluoreszenzanisotropie der Fluoreszenzsonde 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien wurde eine Erhöhung der „Fluidität“ der Mitochondrienmembran bestimmt. Die Ergebnisse der Anisotropiemessungen stellen den Nachweis für die Interkalation des A β ₁₋₄₂ Peptids in die Mitochondrienmembran dar.

Für Proteomanalysen wurden solubilisierete Proteine aus isolierten Mitochondrien in einer zweidimensionalen-blau-nativen/Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-BN/SDS-PAGE) aufgetrennt und die Proteinuntereinheiten im Gel durch Peptidmassenfingerprint (PMF) mittels Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionisation-Massenspektrometrie

(MALDI-MS) identifiziert. Die Proteinmenge der Untereinheiten wurde anhand SYPRO® Ruby gefärbter 2D-Gele quantifiziert. Es wurden insgesamt 41 Proteine für OLN-93 identifiziert und 32 für SH-SY5Y. Der große Vorteil der eingesetzten 2D-BN/SDS-PAGE für die quantitative Proteomanalyse gegenüber der herkömmlichen Methode, die eine denaturierende isoelektrische Fokussierung in der 1. Dimension anwendet, ist die Möglichkeit der Auftrennung hydrophober Membranproteine sowie der Erhalt von Informationen über Protein-Protein-Interaktionen. 14% der quantifizierten Untereinheiten in OLN-93 Proben wurden durch A β ₁₋₄₂ signifikant beeinflusst. In OLN-93 Proben verringerten sich durch A β ₁₋₄₂ die Proteinmengen der α - und β -Untereinheiten der F₁F₀ ATP Synthase (CV) in ihrem monomeren und dimeren Assemblierungszustand. Es wird daher davon ausgegangen, dass A β ₁₋₄₂ in einer Absenkung der ATP Synthese resultiert, die die gefundene Verringerung der ATP Konzentration in A β ₁₋₄₂-behandelten OLN-93 Zellen erklärt. Darüber hinaus wurden für die Pyruvatkinase und ein nicht identifiziertes Protein geringere Proteinmengen gefunden. In SH-SY5Y Proben zeigten 30% der quantifizierten Untereinheiten A β ₁₋₄₂-induzierte Veränderungen. Die Proteinmengen der α - und β -Untereinheiten von CV Dimer, der γ -Untereinheit von CV Monomer sowie der CII Untereinheit SDHA nahmen zu. Es wird postuliert, dass es sich dabei um Kompensationsmechanismen handelt, um Aktivitätsverluste, wie sie z.B. für CII im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessen wurden, auszugleichen. Die Proteinmengen von vier nicht identifizierten Proteinen erhöhten sich ebenfalls durch A β ₁₋₄₂. Die Hsp60 Menge nahm jedoch ab, wie auch die Proteinmengen von drei weiteren Proteinen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden konnten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden signifikante, A β ₁₋₄₂-induzierte Veränderungen der Zellphysiologie und der mitochondrialen Funktion gefunden. Diese Erkenntnisse können zur Entwicklung von Präventionsmöglichkeiten sowie Therapien beitragen, weil sie Informationen über die Anfangsphase der AD Pathogenese liefern.

1.2 Alzheimer's disease triggering amyloid- β peptide alters cell physiology and mitochondrial function

Alzheimer's disease (AD) is the most abundant form of dementia. It is characterized by slowly progressing neurodegeneration resulting in irrecoverable loss of cognitive functions. The constantly rising number of AD patients leads to financial and social burden for society. Thus, the development of prevention options as well as therapies is of great importance.

A β peptides play a crucial role in AD pathogenesis. They are generated from posttranslational processing of the amyloid precursor protein (APP), a type I transmembrane protein [1, 2]. Recent studies identified intracellular monomeric and oligomeric A β peptides as neurotoxic forms (oligomer hypothesis) [3-7] whereof A β_{1-42} is the most pathogenic isoform [8, 9]. Synapses are mainly affected by A β neurotoxicity [3]. It is known that mitochondria located in synapses exhibit dysfunctions already in the very early phase of AD pathogenesis [10]. Hence, this study focused on mitochondria to characterize their significant functional alterations in the early phase of AD pathogenesis.

The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y and the rat oligodendroglia cell line OLN-93 were used as model systems in this study. Cells were incubated with 2.0 μ M disaggregated A β_{1-42} peptides for 24 h. The externally applied peptides were located intracellular. Then effects of A β_{1-42} on cell physiology, oxidative stress, energy metabolism, mitochondrial membranes and proteome were analyzed.

Disaggregation of A β_{1-42} peptides with trifluoroacetic acid resulted in monomers to heptamers. These peptides (labeled with fluorescent markers) were found in late endosomes after 5 h of incubation. After 16 h A β_{1-42} peptides were located in mitochondria. It appeared that mitochondria of OLN-93 cells incorporated higher amounts of A β_{1-42} peptides than SH-SY5Y cells. Due to the peptide's endosomal localization after a short incubation time it is postulated that its uptake is achieved by endocytosis.

AlamarBlue® assay and neutral red uptake assay were used to determine cell viability which was not significantly affected upon A β_{1-42} treatment. Externalization of phosphatidylserine is characteristic of early apoptotic cells. Phosphatidylserine presented to the extracellular matrix is recognized by Annexin V. However, late apoptotic cells as well as necrotic cells lose integrity of plasma membrane enabling propidium iodide to intercalate into DNA. There was no A β_{1-42} induced change in the number of apoptotic/necrotic cells for both cell lines which was detected by flow cytometry analysis after treatment with FITC Annexin V and propidium iodide.

Intracellular cleavage of the cell-permeant 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate by esterases and oxidation by peroxidases in the presence of hydrogen peroxide results in the fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) that is used as a indicator for reactive oxygen species (ROS). Measuring the DCF fluorescence revealed a high increase (>120%) in the cellular ROS amount in A β_{1-42} treated samples compared to untreated samples. Thus, A β_{1-42} leads to increased ROS generation and/or interference of ROS scavenging systems. ROS induce protein oxidation that may result in activity loss of affected proteins. Mitochondrial protein oxidation was determined by quantification of OxyBlots™ detecting protein carbonyl-

ation. A β ₁₋₄₂ treatment led to a slight increase of mitochondrial protein carbonylation that was interrelated to detections of cellular protein carbonylation by others.

Determination of specific activities of enzymes involved in oxidative phosphorylation (OxPhos complexes) and cellular ATP concentration was used to investigate the influence of A β ₁₋₄₂ peptides on energy metabolism. Photometric measurements with isolated mitochondria or cell lysates were applied to determine specific activities of OxPhos complexes. Both cell lines showed decreased activity of NADH-ubiquinone oxidoreductase (CI) but increased activity of cytochrome c oxidase (CIV) upon A β ₁₋₄₂ treatment. A β ₁₋₄₂ peptides did not influence activity of succinate dehydrogenase (CII) in OLN-93 cells, but decreased CII activity was found in SH-SY5Y cells. Activity loss of CI and CII implies further ROS generation. Increase of CIV activity is explained by enhanced protein amount and/or increased super-complex formation. Cellular ATP concentration was identified via luciferase catalyzed and ATP mediated oxidative decarboxylation of D-luciferin. Measuring the emerging luminescence revealed a decrease in the cellular ATP concentration in A β ₁₋₄₂ treated compared to untreated samples. Thus, A β ₁₋₄₂ peptides cause reduced ATP synthesis and/or increased ATP consumption.

A β ₁₋₄₂ peptides also influenced mitochondrial membranes. Mitochondrial membrane potential (MMP) was analyzed via reduced MitoTrackers® by flow cytometry. In A β ₁₋₄₂ treated samples depolarization of the MMP was detected. It is explained by A β ₁₋₄₂ mediated loss in activity of CI and CII (demonstrated in this study). A β ₁₋₄₂ induced channel formation in mitochondrial membranes may also result in depolarization of the MMP. Steady-state anisotropy measurements of the fluorescent probe 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene were used as indicator for "fluidity" of mitochondrial membranes. A β ₁₋₄₂ caused an increase of "fluidity" of mitochondrial membranes. The result of anisotropy measurements proves the intercalation of the peptide into the membrane.

For proteome analyses solubilized proteins obtained from isolated mitochondria were separated via two dimensional-blue-native/sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis (2D-BN/SDS-PAGE). Protein subunits were identified by peptide mass fingerprint (PMF) with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). Quantification of protein subunits was executed on the basis of SYPRO® Ruby stained 2D-gels. A total of 41 proteins were identified for OLN-93 and 32 for SH-SY5Y, respectively. The huge advantage of 2D-BN/SDS-PAGE for the application in quantitative proteomics compared to the common method that uses denaturizing isoelectric focusing in the first dimension is the feasibility of separating hydrophobic membrane proteins as well as the preservation of protein-protein interactions. 14% of quantified subunits in OLN-93 samples were significantly influenced by A β ₁₋₄₂. Protein amounts of subunits α and β of F₁F₀ ATP synthase (CV) monomer and dimer were reduced in A β ₁₋₄₂ treated OLN-93 samples. Thus, it is assumed that A β ₁₋₄₂ causes a reduction in ATP synthesis that explains the decreased cellular ATP concentration that was found in this study for A β ₁₋₄₂ treated OLN-93 samples. Furthermore, pyruvate kinase and a not identified protein showed decreased protein amounts upon A β ₁₋₄₂ treatment. In SH-SY5Y samples 30% of quantified subunits exhibited A β ₁₋₄₂ mediated alterations. Increased protein amounts of subunits α and β of CV dimer, subunit γ of CV

monomer as well as of CII subunit SDHA were found in A β ₁₋₄₂ treated SH-SY5Y samples. These findings may be part of compensatory mechanisms to balance e.g. activity loss of CII (determined in this study) and CV. Additionally, four not identified proteins exhibited increased protein amounts. Decreased protein amounts were found for Hsp60 and three not identified proteins in A β ₁₋₄₂ treated SH-SY5Y samples.

This study revealed significant A β ₁₋₄₂ induced alterations of cell physiology and mitochondrial function. Findings may contribute to the development of prevention options as well as therapies since they provide information about the early phase of AD pathogenesis.

2 Einleitung

2.1 Demenzerkrankungen

Auf der Erde leben im Jahr 2015 circa 7,3 Milliarden (Mrd.) Menschen, von denen fast 900 Millionen (Mio.) 60 Jahre und älter sind [11]. Aufgrund der verbesserten Lebensbedingungen (u.a. medizinische Versorgung, gesunde Ernährung sowie sportliche und geistige Betätigung) sinkt die Sterberate unter den älteren Menschen und die Lebenserwartung nimmt weiter zu. Mit einem erhöhten Lebensalter steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit an einer chronischen Krankheit wie z.B. Demenz zu erkranken.

Demenz beschreibt eine Gruppe von Krankheitsbildern, bei denen wichtige Gehirnfunktionen wie Gedächtnis, Orientierung, Sprache und Lernfähigkeit (kognitive Funktionen) nach und nach unwiederbringlich verloren gehen [12]. Die Alzheimer Demenz ist mit zwei Drittel aller Fälle die häufigste Form der Demenz [13], gefolgt von der vaskulären Demenz, der frontotemporalen Demenz und der Lewy-Körperchen-Demenz. Weltweit leben derzeit geschätzt 46,8 Mio. demenzkranke Menschen (siehe Abb. 1A). Diese Zahl wird sich wahrscheinlich alle 20 Jahre fast verdoppeln und im Jahr 2050 131,5 Mio. erreichen, sofern kein Durchbruch in der Prävention und Therapie von Demenzerkrankungen erzielt wird. Jährlich kommt es demnach zu mehr als 9,9 Mio. Neuerkrankungen weltweit, wobei die Inzidenz (Neuerkrankungswahrscheinlichkeit) exponentiell mit ansteigendem Alter zunimmt. Betragen die Kosten für die Versorgung Demenzkranker 2010 noch 567 Mrd. Euro, sind sie mittlerweile auf 768 Mrd. Euro angestiegen und werden 2018 939 Mrd. Euro betragen (siehe Abb. 1B). Bis 2030 werden sich die Kosten im Vergleich zu 2018 wahrscheinlich verdoppeln. Die heutigen Aufwendungen für die Versorgung dementer Menschen belaufen sich auf 1,09% des globalen Bruttoinlandsprodukts und übertreffen damit den Marktwert von Firmen wie Apple (697 Mrd. Euro) oder Google (345 Mrd. Euro) [11].

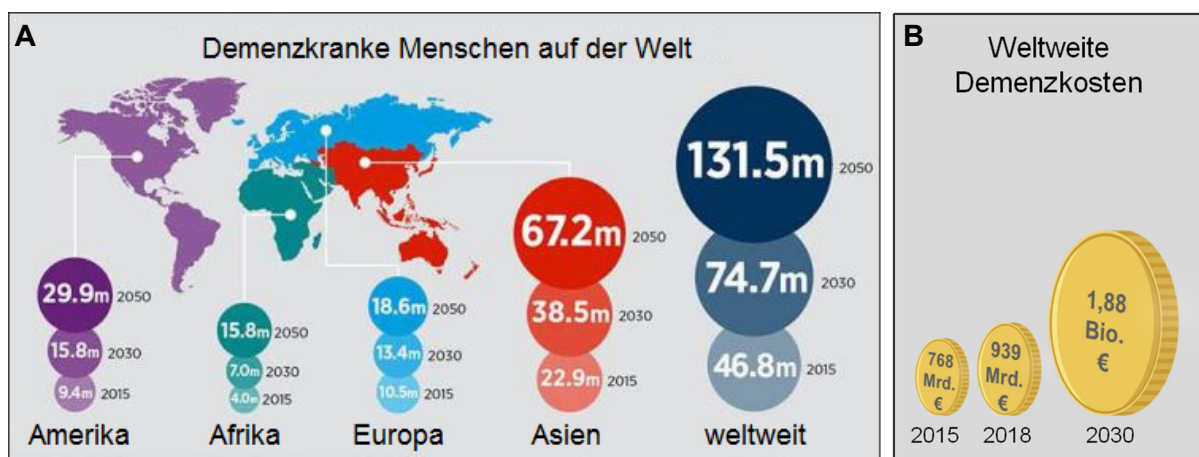


Abb. 1: Weltweite Entwicklung (A) der Anzahl Demenzkranker und (B) der krankheitsbedingten Kosten. Auf allen Kontinenten nimmt die Krankenzahl kontinuierlich zu, weil die Lebenserwartung aufgrund verbesserter Lebensbedingungen steigt und das Alter den Hauptrisikofaktor darstellt. Im gleichen Maß wie sich die Krankenzahl vermehrt, erhöhen sich auch die Versorgungskosten für Demenzkranke. (Abb. übersetzt bzw. erstellt nach [11, 14])

Deutschland liegt nach China, den USA, Indien und Japan auf dem fünften Platz was die Gesamtzahl an Demenzkranken betrifft [15]. Aufgrund der demographischen Veränderungen wird der Anteil älterer Menschen (65 Jahre und älter) von derzeit 20,5% auf ca. 33% im Jahr 2050 zunehmen, wobei sich die Gesamtbevölkerung in Deutschland im gleichen Zeitraum von 81,8 auf 69,4 Mio. verringern wird. Der Anteil Demenzkranker unter den Menschen, die 65 Jahre und älter sind, wird sich von 8,6% auf 12,9% erhöhen (siehe Abb. 2). Demenzen mit frühem Beginn (vor dem 65. Lebensjahr) machen derzeit weniger als 2,0% aller Demenzfälle in Deutschland aus (ca. 20.000 Personen) [12, 15].

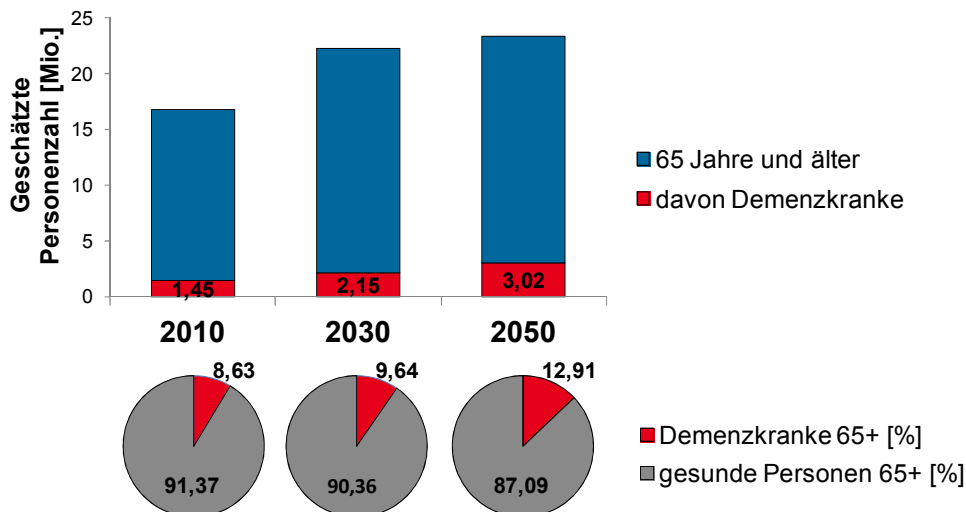


Abb. 2: Geschätzte Zunahme der Krankenzahl in Deutschland von 2010 bis 2050. (erstellt nach [15])

Einer europäischen Feldstudie (EuroCoDe von Alzheimer Europe [16]) zufolge verdoppeln sich die Prävalenzraten (Anteil der Kranken an der gleichaltrigen Bevölkerung) im Abstand von jeweils etwa fünf Jahren (siehe Tab. 1). Sie nehmen von 1,6% in der Altersgruppe der 65-69-Jährigen auf rund 41% unter den über 90-Jährigen zu. Zwei Drittel aller Erkrankten sind demnach 80 Jahre und älter. Da Frauen eine höhere Lebenserwartung haben als Männer (82,5 zu 77,3 Jahre im Jahr 2011), sind 70% aller Demenzkranker weiblichen Geschlechts [12, 15].

Tab. 1: Prävalenz von Demenzerkrankungen in Deutschland in Abhängigkeit vom Alter. (modifiziert nach [15])

Altersgruppe	Mittlere Prävalenzrate nach EuroCoDe [%]	Geschätzte Krankenzahl (Ende 2012)
65-69	1,60	62.900
70-74	3,50	169.300
75-79	7,31	264.700
80-84	15,60	362.900
85-89	26,11	356.800
90+	40,95	256.500
65+	8,82	1.473.100

Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen nimmt ebenfalls mit dem Alter zu (siehe Tab. 2). Beträgt das Erkrankungsrisiko unter den 65-69-Jährigen durchschnittlich 0,4%, sind in der Altersgruppe 90+ 10,1% betroffen. Jährlich erkranken somit mehr als 300.000 Menschen in Deutschland an einer Form von Demenz. Bei den Demenzen mit frühem Beginn treten jährlich schätzungsweise 6.000 neue Fälle auf [15].

Tab. 2: Jährliche Inzidenzwahrscheinlichkeit in Deutschland in Abhängigkeit vom Alter.
(modifiziert nach [15])

Altersgruppe	Mittlere Inzidenzrate pro Jahr [%]	Geschätzte Zahl der Neuerkrankungen (2013)
65-69	0,4	15.500
70-74	0,9	42.000
75-79	1,9	63.800
80-84	4,1	80.500
85-89	6,5	65.600
90+	10,1	37.400
65+	1,9	304.800

Demenzerkrankungen verkürzen aufgrund ihrer Irreversibilität die altersübliche Lebenserwartung. Die genaue Krankheitsdauer lässt sich jedoch nicht mit hoher Zuverlässigkeit vorhersagen (mittlere Krankheitsdauer 3 bis 6 Jahre). Die Überlebenszeit ist abhängig vom Alter zum Zeitpunkt der Erkrankung, vom Grad der Symptome und körperlichen Begleiterscheinungen. In Deutschland werden Demenzerkrankungen nicht im Sterberegister als Todesursache vermerkt, obwohl dies seit 1995 von der Weltgesundheitsorganisation empfohlen wird. Dies liegt daran, dass schwer festzustellen ist, ob Demenz als Grunderkrankung oder als Folgeerkrankung zum Tod geführt hat. Trotzdem wird angenommen, dass rund ein Drittel der Verstorbenen über 65 Jahren in der letzten Lebensphase an einer Demenz gelitten haben. Das bedeutet, dass in Deutschland jährlich etwa 250.000 demente Menschen sterben [15].

Auch wenn sich die Anzahl Demenzkranker kontinuierlich erhöht, hat das Erkrankungsrisiko nicht zugenommen. Es gibt sogar erste Hinweise auf rückläufige Inzidenzen. Ursächlich dafür könnten vor allem die verbesserten Lebensbedingungen sein [15]. Ein guter körperlicher Allgemeinzustand sowie eine fett- und cholesterinarme Ernährung gelten als möglicher Schutz, wobei dies wissenschaftlich nicht eindeutig belegt ist. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass es durch ein geistig und sozial sehr aktives Leben möglich ist, angehäuften Wissen noch lange zu nutzen, auch wenn die Fähigkeit zum Lernen, Denken und Kombinieren allmählich nachlässt [12].

2.2 Die Alzheimer Demenz

Bei der Alzheimer Demenz (AD) handelt es sich um die häufigste Form unter den Demenzerkrankungen. Eine endgültige Diagnose lässt sich jedoch erst post mortem durch eine Biopsie des Gehirns stellen [17]. AD beginnt im Bereich des Hippocampus (Teil des

limbischen Systems), wodurch die Bildung neuer Erinnerungen und das Lernen beeinträchtigt werden. Zudem ist der Hippocampus an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt. Im Krankheitsverlauf breitet sich die Hirnschädigung immer weiter aus (siehe Abb. 3). Die Hirnventrikel vergrößern sich, wohingegen die Großhirnrinde (Cortex), in der Gedächtnisinhalte gespeichert sind, dünner wird. Der dünner werdende Cortex ist dabei geprägt von einer Erweiterung der Sulci (Furchen) und dem Rückgang der Gyri (Falten der Hirnoberfläche). Es kommt zu einer Hirnvolumenminderung (Atrophie) von bis zu 20% infolge der Erkrankung. Ist die linke Hemisphäre des Großhirns (Telencephalon) betroffen, treten Sprachprobleme auf (Aphasie), eine Schädigung des visuellen Systems im Temporallappen erschwert zunehmend die Erkennung bekannter Gesichter und Objekte. Das Einschätzen von Distanzen sowie von drei Dimensionen wird bei Beeinträchtigung des rechten Parietallappens eingeschränkt und das Treffen von Entscheidungen, Planen sowie Organisieren gestaltet sich unter Schädigung des Frontallappens als schwierig [18].

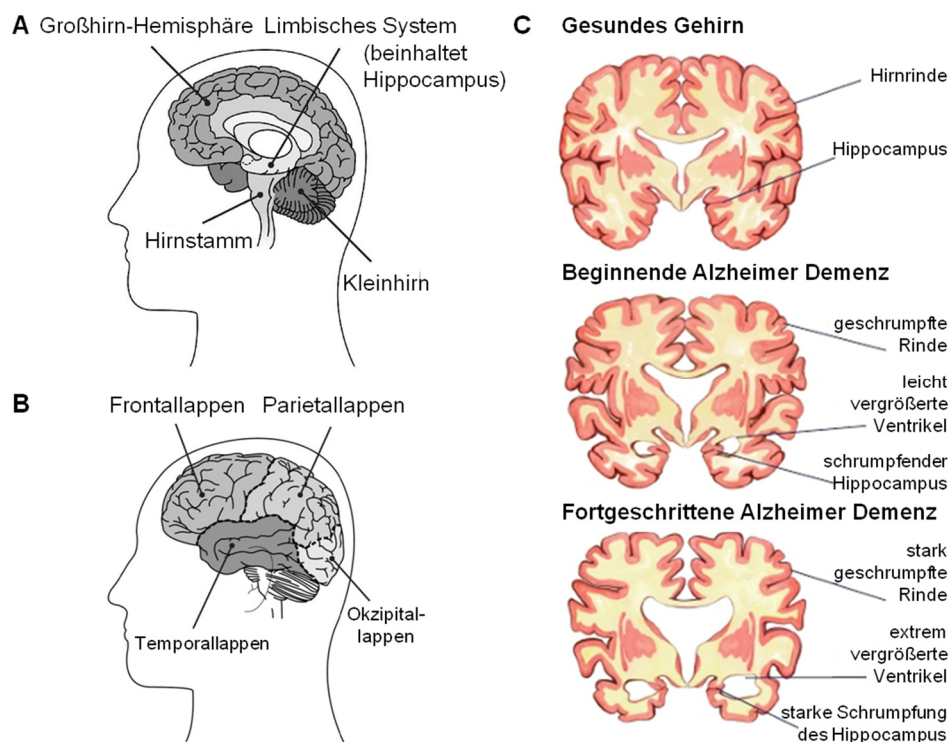


Abb. 3: Die von der Alzheimer Demenz betroffenen Hirnareale. (A) AD beginnt im Hippocampus, der Teil des limbischen Systems ist und breitet sich dann über die Großhirnrinde aus, wobei (B) alle Teile des Großhirns betroffen sind. (C) Im Krankheitsverlauf schrumpfen Hippocampus sowie die Hirnrinde und die Hirnventrikel erweitern sich (gezeigt ist ein Querschnitt durch das Gehirn in Frontalansicht). (Abb. übersetzt und modifiziert nach [18, 19])

Bereits 1906 konnte der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer bei der post mortem Untersuchung des Gehirns seiner Patientin Auguste D., die bereits im Jahr 1901 mit 51 Jahren an kompletter geistiger Verwirrung gelitten hatte, eine weit verbreitete Atrophie feststellen. In großen Teilen des Gehirns waren bis zu 30% der Nervenzellen abgestorben. Zudem entdeckte er dicke Neurofibrillenbündel und plaqueartige Ablagerungen einer noch unbekannten Substanz, die über die gesamte Hirnrinde verteilt waren (siehe Abb. 4).

Alzheimer beschrieb damals zum ersten Mal eine präsenile Demenz, die nach ihm benannt werden sollte [20, 21]. Erst in den 1980er Jahren wurde aufgeklärt, dass die extrazellulären Plaques hauptsächlich aus einem aggregierten, kleinen Peptid namens Amyloid- β ($A\beta$) bestehen [1, 2] und dass sich die innerhalb der Neuronen gefundenen dicken Neurofibrillenbündel (*neurofibrillary tangles*, NFTs) aus tau Proteinen zusammensetzen, die ebenfalls aggregiert sind [22-24].

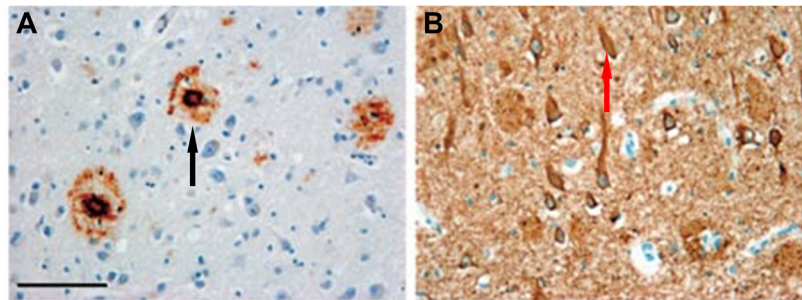


Abb. 4: (A) Amyloide Plaques aus amyloiden- β Peptiden und (B) Neurofibrillenbündel gebildet aus hyperphosphorylierten tau Proteinen. (Größenmaßstab: 100 μ m, Abb. modifiziert nach Haass und Selkoe [25])

Das Phosphoprotein tau gehört zur Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine und kommt im menschlichen Gehirn in sechs Isoformen mit 352-411 Aminosäuren Länge vor. Es ist hauptsächlich im neuronalen Axon lokalisiert, wo es Mikrotubuli stabilisiert. Tau Proteine weisen eine ungewöhnlich hohe Anzahl an potentiellen Phosphorylierungsstellen auf (bis zu 45 Serine, 35 Threonine und 4 Tyrosine, abhängig von der Isoform) [26], über die die Bindung an Mikrotubuli reguliert wird. Bei AD wird das tau Protein posttranslational hyperphosphoryliert, wodurch es von den Mikrotubuli dissoziiert, die wiederum kollabieren. Das hyperphosphorylierte tau Protein aggregiert im somatodendritischen Kompartiment der Neuronen und bildet so NFTs [27]. Das amyloide- β Peptid, aus dem die Plaques bestehen, wird im nachfolgenden Kapitel 2.3 im Detail besprochen, weil sich die vorliegende Arbeit mit dem Einfluss von $A\beta$ auf neuronale Zellen beschäftigt.

2.3 Das amyloide- β Peptid ($A\beta$)

2.3.1 Entstehung von $A\beta$ Peptiden

Das $A\beta$ Peptid entsteht posttranslational aus dem amyloiden Vorläuferprotein (*amyloid precursor protein*) APP (siehe 7.1) [28]. Das APP Gen ist auf Chromosom 21 lokalisiert und enthält 18 Exons. Durch Spleißvarianten entstehen verschiedene Isoformen, wobei die Isoform APP695 vorherrschend in Neuronen ist [29]. APP ist ein glykosyliertes Typ I Transmembranprotein mit einer großen extrazellulären Domäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne (TMD) sowie einer kurzen APP intrazellulären Domäne (APP *intracellular domain*, AICD) [30]. Es ist in der Plasmamembran, im trans-Golgi Netzwerk, im endoplasmatischen Reticulum (ER) sowie in endosomalen, lysosomalen und mitochondrialen Membranen

lokalisiert [31-33]. Es wird angenommen, dass APP eine Rolle in der Zelladhäsion und -bewegung einnimmt [34, 35].

Zur Generierung von neurotoxischem A β Peptid (siehe Abb. 5, amyloidogener Weg) wird das APP durch eine β -Sekretase innerhalb der extrazellulären Domäne proteolytisch geschnitten, wodurch ein lösliches APP β (s APP β) sowie ein membranassoziertes C99 Fragment, das die A β Sequenz beinhaltet, entstehen. Eine γ -Sekretase spaltet dann das C99 Fragment innerhalb der TMD in das extrazellulär bzw. Lumen lokalisierte A β Peptid und ein γ -Sekretase C-terminales Fragment (γ CTF), das im Cytosol gefunden wird. Derzeit ist jedoch nicht vollständig verstanden, wie diese abnormale APP Prozessierung ausgelöst wird [36, 37], denn physiologisch wird APP hauptsächlich durch eine α -Sekretase gespalten. Da sich die Schnittstelle innerhalb der A β Sequenz befindet, ist keine A β Generierung über den sogenannten nicht-amyloidogenen Weg möglich (siehe Abb. 5). Durch die α -Sekretase Aktivität entstehen sAPP α und ein membranassoziertes C83 Fragment, das von der γ -Sekretase innerhalb der TMD zu extrazellulärem bzw. lumenseitigem P3 und cytosolischem γ CTF prozessiert wird [30].

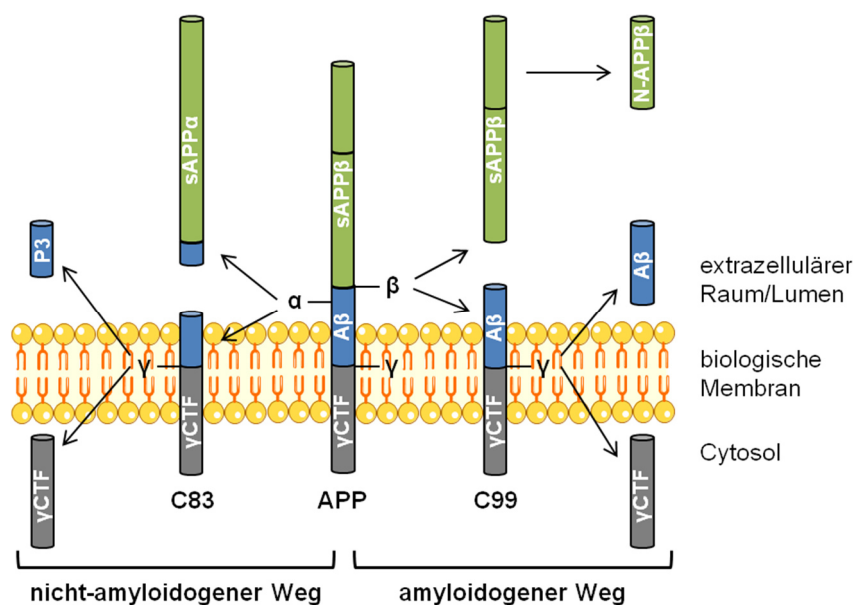


Abb. 5: Amyloidogene und nicht-amyloidogene Prozessierung des amyloiden Vorläuferproteins APP. Zur Generierung von A β Peptiden (amyloidogener Weg) wird APP durch eine β - und γ -Sekretase proteolytisch gespalten. Es entstehen lösliches APP β (sAPP β), γ -Sekretase C-terminales Fragment (γ CTF) und A β . Durch die weitere Prozessierung von sAPP β wird N-APP β gebildet. Bei der nicht-amyloidogenen APP Prozessierung werden lösliches APP α (sAPP α), γ CTF und P3 durch α - und γ -Sekretase Aktivität erhalten. Die α -Sekretase schneidet dabei innerhalb der A β Sequenz. (Abb. erstellt nach LaFerla et al. [38])

Die α -Sekretase ist eine Disintegrin- und Metalloproteinase (*a disintegrin and metalloproteinase*, ADAM), die zur Zinkprotease Superfamilie gehört und als Typ I Transmembranprotein exprimiert wird [39-41]. ADAM-10 weist ein hohes Expressionslevel im humanen Gehirn auf [42, 43]. Beim nicht-amyloidogenen Weg wird durch die α -Sekretase das neuroprotektive sAPP α generiert [44-46]. Es wird angenommen, dass es am Neuritenwachstum (*neurite outgrowth*), der Synaptogenese und der Zelladhäsion beteiligt ist [47].

Bei der β -Sekretase handelt es sich um das β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1). BACE1 ist ein Typ I Transmembranprotein aus der Pepsinfamilie der Aspartatproteasen [48-50], dessen aktive Seite auf der Lumen- bzw. extrazellulären Seite der Membran lokalisiert ist [30]. Es wird bevorzugt im trans-Golgi Netzwerk, in vesikulären Strukturen im Cytosol und in der Plasmamembran exprimiert [51-53], wo es in *Lipid Rafts* lokalisiert ist [54-57]. Das homologe BACE2 [58, 59] prozessiert APP an Position 11 der A β Sequenz [60]. Es wird im humanen Gehirn jedoch nur geringfügig exprimiert [61]. Das durch die β -Sekretase Aktivität gebildete sAPP β weist eine 50- bis 100-fach geringere neuroprotektive Wirkung als das 16 AS längere sAPP α auf [44, 45]. Zudem kann es weiter prozessiert werden, wodurch ein N-terminales APP Fragment (N-APP β) entsteht. Da N-APP β ein Ligand des Todesrezeptors 6 (*death receptor 6*, DR6) ist, kommt es zum neuronalen Zelltod durch die Aktivierung der Caspase-Kaskade [62, 63].

Die γ -Sekretase ist ein großer Proteinasekomplex, der aus mindestens vier verschiedenen Transmembranproteinen besteht: Presenilin 1 oder 2 (PS1, PS2), Presenilin Verstärker 2 (*presenilin enhancer 2*, PEN2), *anterior pharynx-defective 1* (APH1) und Nicastrin [64]. Eine posttranslationale Modifikation des Nicastrins ist für die Assemblierung des γ -Sekretase Komplexes verantwortlich [65]. Das PS enthält die Proteaseaktivität [66, 67], die durch PEN2 vermittelte Endoproteolyse entsteht [68]. APH1 wird ebenfalls für die proteolytische Aktivität benötigt [69]. Da der Komplex aus einer von zwei PS Varianten sowie einer von drei APH1 Isoformen gebildet wird, wird APP an mindestens sechs verschiedenen Stellen prozessiert, wodurch beim amyloidogenen Weg A β Peptide mit unterschiedlichen Längen generiert werden. Es kommen dadurch A β Peptid Isoformen mit 38-43 AS *in vivo* vor, wobei hauptsächlich A β_{1-40} entsteht [30]. Etwa 10% der A β Peptide sind 42 AS lang [38]. Die γ -Sekretase prozessiert neben APP noch viele andere Transmembranproteine innerhalb ihrer TMD [70]. Sowohl beim amyloidogenen als auch beim nicht-amyloidogenen Weg werden durch die γ -Sekretase γ CTFs gebildet, die entweder schnell degradiert werden (nicht-amyloidogener Weg) oder an Cofaktoren, die die Transkription regulieren, binden (amyloidogener Weg). Über die Cofaktoren wird das γ CTF in den Nukleus translokiert, wo es wahrscheinlich an der Regulation verschiedener Zielgene beteiligt ist [71].

Bei AD mit frühem Beginn (*familial Alzheimer's disease*, FAD) liegen autosomal dominante Mutationen in den Genen für das APP, PS1 und/oder PS2 vor. Eine Mutation im APP Gen führt zu einer vermehrten A β Generierung [72] und durch Mutationen in den Presenilinen wird selektiv mehr A β_{1-42} gebildet [73, 74]. Auch bei der durch das Altern bedingten AD (*sporadic AD*) werden erhöhte Konzentrationen an A β_{1-42} gefunden, die Ursache dafür ist jedoch unbekannt [75].

2.3.2 Das A β_{1-42} Peptid

A β_{1-42} ist die häufigste intraneuronale Isoform [76], obwohl lediglich 10% der gebildeten A β Peptide 42 Aminosäuren lang sind [38]. Unter den sechs Isoformen (38-43 AS lang) ist A β_{1-42} das hydrophobste Peptid und es weist die größte Fähigkeit zur Aggregation auf [25]. Wahrscheinlich handelt es sich bei A β_{1-42} um die pathogene Form, die zur Alzheimer Demenz führt [8, 9].

A β ₁₋₄₂ ist aus 28 Aminosäuren (AS) der extrazellulären APP Domäne (AS 1-28) und 14 AS der APP TMD (AS 29-42) aufgebaut (siehe Abb. 6 und 7.1). Die Tertiärstruktur von monomeren A β ₁₋₄₂, ermittelt in einem Membran-nachahmenden System bestehend aus SDS und Wasser (ermöglichte die Ausbildung von SDS-Mizellen) bei pH 7,2 [77], ist geprägt von einer längeren Kette (AS 1-9) sowie zwei α -Helices (AS 10-24 und 28-42), die durch eine Windung (AS 25-27) miteinander verbunden sind. Die stabilsten helikalen Regionen wurden zwischen den Resten 15 und 24 sowie zwischen 28 und 36 gefunden. Zudem wurde für die Reste 40 (Val) und 41 (Ile) eine Präferenz zur β -Faltblattstruktur bestimmt. Neueste Strukturauflösungen an löslichen A β ₁₋₄₂ Monomeren in einem physiologischen Puffersystem (20 mM Phosphat, pH 7,4) [78] ergaben jedoch eine *Random Coil*-ähnliche Struktur mit einer geringen Präferenz zu vier β -Faltblattstrukturen (AS 2-7, 16-23, 28-32 und 34-36). Die gefundenen β -Faltblattstrukturen korrelierten dabei mit β -Faltblattsegmenten, die bereits in A β Fibrillen beobachtet wurden [79, 80].



Abb. 6: Aminosäuresequenz von A β ₁₋₄₂. Hydrophobe Aminosäuren (AS) sind in orange dargestellt, saure in blau, basische in grün und polare in lila. AS, die in der ehemaligen Transmembrandomäne des APP lokalisiert waren, sind grau hinterlegt. (Abb. erstellt nach UniProtKB - P05067 [81])

Neben A β ₁₋₄₂ gibt es weitere Spezies, deren C-terminus AS 42 ist, die N-termini sind jedoch so verkürzt, dass die A β Sequenz mit einem Glutamat (AS 3 oder 11) beginnt [82-84]. Bisher ist allerdings nicht bekannt, ob diese Verkürzung durch eine Variante der APP Prozessierung hervorgerufen wird (wahrscheinlich für A β _{11-x}) oder durch eine Aminopeptidase, die posttranslational *full-length* A β schneidet [85]. N-terminales Glutamat wird unter sauren Bedingungen, wie sie in sekretorischen Kompartimenten vorliegen, von der Glutamylcyclase intramolekular dehydriert, wodurch ein Pyroglutamat (pE) entsteht [82, 84, 86, 87]. Pyroglutamat-A β _{x-42} (A β _{pE-42}) ist hydrophober als das *full-length* Peptid und weist eine höhere Präferenz zur Oligomerisierung und Aggregation auf [88-90]. Zudem ist es resistenter gegenüber der proteolytischen Degradation [91]. Es existieren Hinweise, dass pE-A β aufgrund seiner Aggregationsneigung frühzeitig in Plaques abgelagert wird [84]. Außerdem scheint es als Fibrillenkeim zu fungieren und beschleunigt so die Oligomerisierung sowie Fibrillation anderer A β Spezies [89, 92]. In Plaques von AD Gehirnen wurden 25% der gesamten A β _{x-42} Menge als A β _{pE3-42} gefunden [93].

2.3.3 Neurotoxizität verschiedener A β Spezies

Lange Zeit fokussierte sich die Forschung auf die extrazellulären Plaques (siehe Abb. 7), die bereits 1906 von Alois Alzheimer [21] beschrieben wurden. Es wurde angenommen, dass das Nervenzellsterben durch die Toxizität von unlöslichen, amyloiden Fibrillen hervorgerufen wird (sogenannte Amyloide Plaque-Hypothese) [94-96]. Doch dann fand man heraus, dass A β zwar essentiell für den Gedächtnisverlust ist, jedoch nicht in seiner fibrillären Form [97]. In

der Tat werden A β Plaques in 40% der älteren Menschen gefunden, bei denen keine AD diagnostiziert wurde [98]. Aus diesem Grund erlangte in den letzten zehn Jahren die potenziell pathogene Rolle von intraneuronalen A β Oligomeren (Di- und Trimere sowie höhere Oligomere) einen immer größeren Stellenwert (Oligomer-Hypothese) [3-7]. Es wird davon ausgegangen, dass Di-, Tri- und Tetramere toxischer sind als Monomere [99]. Im humanen Gehirn werden hauptsächlich A β Dimere [100] der Isoform A β ₁₋₄₂ [101] gefunden. Vermutlich wird der Großteil der A β Peptide an der Plasmamembran oder innerhalb des sekretorischen Weges gebildet, wodurch sie schnell ins extrazelluläre Kompartiment gelangen [38]. Intrazellulär werden A β Peptide im ER, in den Endosomen, im Golgi-Apparat, im Nukleus sowie in den Mitochondrien gefunden [102]. Ob die Oligomerisierung intra- oder extrazellulär stattfindet, wird in der Literatur derzeit noch kontrovers diskutiert [103, 104]. In Tri- und Tetrameren finden sich konservierte β -Faltblattstrukturen, die extrazellulär als Keim für die Fibrillenbildung fungieren [105]. Die Aggregation der A β Fibrillen führt letztendlich zur Entstehung von amyloiden Plaques. Extrazelluläre A β Monomere und Dimere werden rezeptorvermittelt wieder in die Zellen aufgenommen. Die Peptide binden dafür als Agonisten u.a. an den $\alpha 7$ nikotinischen Acetylcholinrezeptor ($\alpha 7$ nAChR) [106, 107], das *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1* (LRP1) [108] und den *Scavenger Receptor for Advanced Glycation End Products* (RAGE) [109]. A β Oligomere können aber auch an die Oberfläche von Synapsen (bevorzugt an cholesterinreiche Bereiche im postsynaptischen Kompartiment) binden und dort funktionale Rezeptoren, wie den NMDA Rezeptor zerstören. Dies führt zu synaptischen Dysfunktionen durch vermehrten Ca²⁺ Einstrom [110, 111], wodurch Stress für die Mitochondrien und das ER entsteht [112]. Neben der gestörten Ca²⁺ Homöostase kommt es zu weiteren neuronalen Dysfunktionen in Form von Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität durch Inhibition der Langzeit-Potenzierung und/oder durch Förderung der Langzeit-Depression, Tau Hyperphosphorylierung, Verminderung des schnellen axonalen Transports von Organellen, oxidativem Stress und Inhibierung des Proteasoms, was letztendlich im Zelltod endet [3].

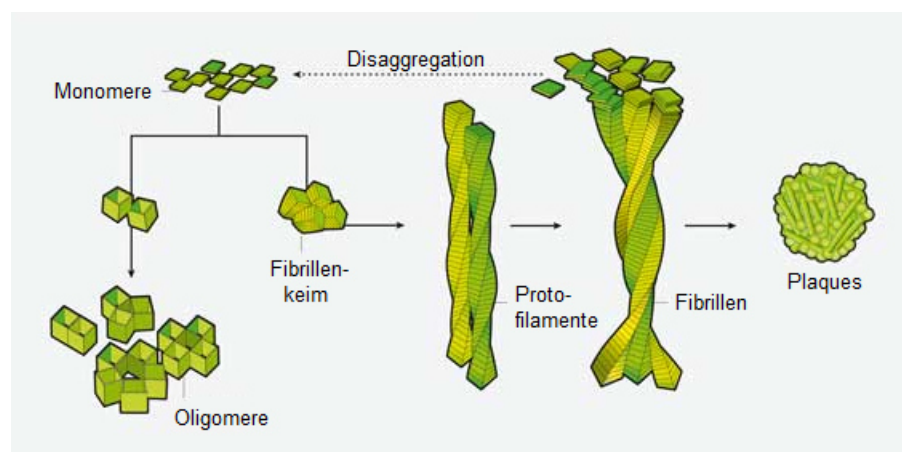


Abb. 7: Verschiedene A β Spezies. A β Monomere können intrazellulär zu Oligomeren aggregieren oder es bilden sich extrazellulär A β Fibrillen aus, aus denen die amyloiden Plaques bestehen. (Abb. übersetzt nach Schnabel et al. [113])

Aβ Peptide inhibieren zwar das Proteasom [114] und verhindern somit den Abbau ubiquitinielter Proteine, aber nicht den eignen. Intrazellulär werden sie durch das Insulin-abbauende Protein (*insulin degrading enzyme*, IDE), das u.a. im Cytosol, in Peroxisomen und in Endosomen lokalisiert ist, degradiert [115]. Die *Presequence* Protease (PreP) baut Aβ Peptide in den Mitochondrien ab [116-118] und extrazelluläres Aβ wird von der Neutralen Endopeptidase (NEP) degradiert [119]. Bei allen drei Enzymen handelt es sich um Metallproteasen mit einem Zinkfingermotiv im aktiven Zentrum. Alzheimerpatienten weisen im Vergleich zu gesunden Menschen des gleichen Alters eine 30%ige Reduktion der Aβ Degradation auf, wobei der genaue Mechanismus unbekannt ist [120]. Ein beeinträchtigtes Aβ Degradationssystem könnte aber ursächlich dafür sein [121-123].

2.4 Zusammenspiel von Aβ Peptiden und tau Proteinen

Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Aβ Peptiden und tau Proteinen bei der Entstehung der Alzheimer Demenz [36]. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht geklärt. Es gibt drei mögliche Interaktionen: Aβ vermittelt die tau Toxizität, indem es die Hyperphosphorylierung von tau induziert [124], Aβ und tau wirken synergistisch oder tau induziert die Aβ Toxizität, indem es spezielle Rezeptoren sensitiv für Aβ macht [125]. Da am Mausmodell gezeigt werden konnte, dass Plaques vor NFTs entstehen, ist es wahrscheinlich, dass Aβ die tau Toxizität vermittelt [126]. Aβ Oligomere und oxidativer Stress scheinen zur tau Hyperphosphorylierung und deren abnormalen Aggregation im somatodendritischen Kompartiment zu führen [127, 128], indem phosphorylierende Kinasen durch eine erhöhte Ca^{2+} Konzentration aktiviert werden [129]. Eine Zunahme an dendritischem tau könnte auch zu einer höheren Konzentration von Aβ in diesem Bereich führen [125]. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass lösliches, hyperphosphoryliertes tau zur neuronalen Dysfunktion beiträgt, bevor es aggregiert [130].

Auch wenn die tau Toxizität nur der sekundäre Prozess zu sein scheint, kommt ihm trotzdem eine große Bedeutung zu. Durch Hyperphosphorylierung von tau werden die Mikrotubuli nicht länger stabilisiert, wodurch der schnelle axonale Transport von Organellen beeinträchtigt wird [27]. Dies betrifft besonders die Mitochondrien. Aufgrund des hohen Energiebedarfs zur synaptischen Übertragung sind in Neuronen die Mitochondrien an den Synapsen konzentriert [131], die tau Toxizität führt jedoch zu einer abnormalen Lokalisation im Soma [132-134]. Hyperphosphoryliertes tau scheint zusätzlich einen Einfluss auf die Dynamik von Mitochondrien zu haben [135] und die mitochondriale Biogenese wird durch Aβ beeinträchtigt [136].

Auch wenn nicht bekannt ist, wie genau das Zusammenspiel zwischen Aβ und tau bei der Entstehung der Alzheimer Demenz erfolgt, scheinen Mitochondrien ein potenziell wichtiges Ziel der Aβ und tau Neurotoxizität zu sein. Im folgenden Kapitel 2.5 wird deshalb näher auf einige in den Mitochondrien ablaufenden Mechanismen näher eingegangen.

2.5 Mitochondrien

Mitochondrien (siehe Abb. 8) sind dynamische Zellorganellen in Eukaryoten, die zusammenhängende Netzwerke bilden können, in denen sie sich teilen und miteinander fusionieren (sogenanntes *fission* und *fusion*). Sie bestehen aus einer äußeren und inneren Mitochondrienmembran, die den Intermembranraum (IMS) einschließt. Die innere Mitochondrienmembran (IMM) ist zur Oberflächenvergrößerung in sogenannte Cristae eingestülpt. Im Gegensatz zur äußeren Mitochondrienmembran (OMM), die für Moleküle mit einer Größe von bis zu 5 kDa durchlässig ist, ist die IMM weitestgehend impermeabel für Ionen und kleine Moleküle (permeabel für O₂, CO₂ und H₂O). In der Mitochondrienmatrix finden u.a. die β -Oxidation der Fettsäuren, der Citratzyklus sowie die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern statt. Mitochondrien besitzen ihre eigene DNA (doppelsträngig, zirkular) und RNA sowie einen kompletten Transkriptions- und Translationsapparat für die Biosynthese von Proteinen. Hauptsächlich dienen Mitochondrien der Bereitstellung chemischer Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) für zelluläre Prozesse, sie spielen aber auch eine wichtige Rolle in der Ca²⁺ Homöostase (Ca²⁺ Speicher) und beim Einleiten der Apoptose (intrinsischer Weg) [137-139].

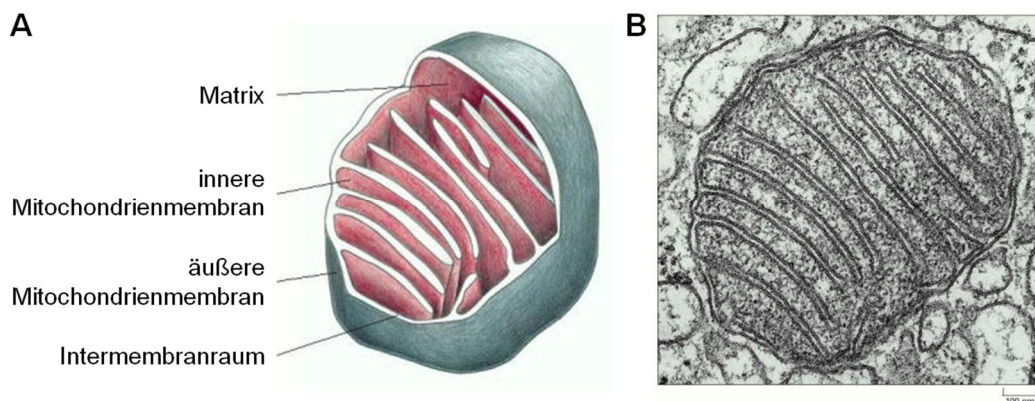


Abb. 8: (A) Schematische und (B) elektronenmikroskopische Darstellung eines Mitochondriums. Mitochondrien sind in zwei Kompartimente aufgeteilt. Der Intermembranraum wird durch die äußere und innere Mitochondrienmembran begrenzt. Das Lumen wird Matrix genannt. (Abb. übersetzt nach Alberts et al. [138])

2.5.1 Die oxidative Phosphorylierung

An der sogenannten oxidativen Phosphorylierung (OxPhos), die der ATP Generierung dient, sind fünf Atmungskettenkomplexe beteiligt. Diese sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und kommen sowohl als individuelle OxPhos Komplexe, als auch Homooligomere und sogenannte Superkomplexe, Assemblierungen verschiedener OxPhos Komplexe, vor [140, 141]. Durch die Ausbildung von Superkomplexen erhöht sich die Stabilität sowie die Aktivität der einzelnen OxPhos Komplexe und es kommt zu weniger Dysfunktionen [142].

Zur ATP Generierung werden Elektronen durch die Atmungskette über Redox-Reaktionen transferiert (siehe Abb. 9). Die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I, CI) oxidiert

NADH und überträgt Elektronen vom primären Elektronenakzeptor Flavinmononukleotid (FMN) über sieben konservierte Eisen-Schwefel-Zentren auf Ubichinon (Q), das zu Ubichinol (QH₂) reduziert wird. Ubichinon wird auch durch Elektronen, die durch Oxidation von Succinat an der Succinat Dehydrogenase (Komplex II, CII) entstehen, reduziert. Ubichinol transferiert Elektronen zur Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III, CIII), wo sie im sogenannten Q-Zyklus zum einen zur Reduktion von Cytochrom c (Cyt c) dienen und zum anderen der Regeneration von Ubichinon. Reduziertes Cyt c überträgt Elektronen auf die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV, CIV), wo sie über vier Redoxzentren zum molekularen Sauerstoff, dem terminalen Elektronenakzeptor, gelangen. Für die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser werden dabei insgesamt vier e⁻ benötigt. Einhergehend mit dem Elektronentransfer in der Atmungskette werden Protonen (H⁺) von der Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Pro transferiertem Elektron werden am Komplex I zwei H⁺ transportiert, am Komplex III ebenfalls zwei H⁺, wobei ein Proton aus der Reoxidation des Ubichinons stammt, und am Komplex IV ein H⁺. Durch den Protonentransfer entsteht ein elektrochemischer Gradient, der von der F₁F₀ ATP Synthase (Komplex V, CV) zur ATP Synthese genutzt wird. Für die Bildung eines ATP Moleküls werden dafür vier H⁺ benötigt [137, 140].

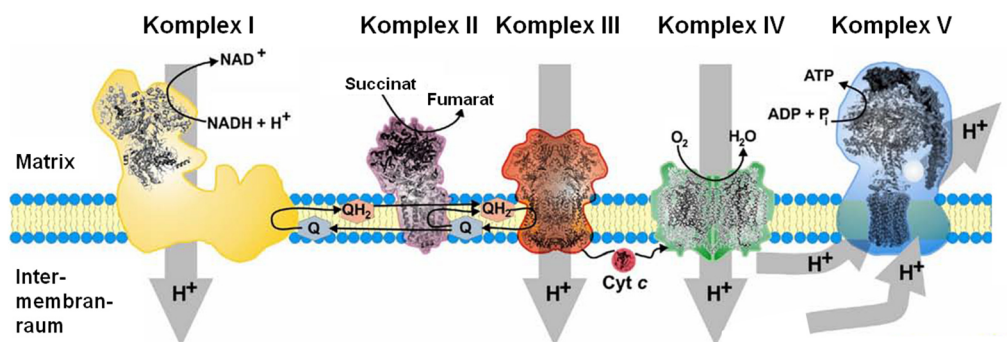


Abb. 9: Prinzip der oxidativen Phosphorylierung. Elektronen von Komplex I und II werden über Ubichinol (QH₂) auf Komplex III übertragen. Von Komplex III gelangen sie über Cytochrom c (Cyt c) zum Komplex IV, wo es zur Reduktion von molekularem Sauerstoff (O₂) zu Wasser (H₂O) dient. Der Elektronentransfer in der Atmungskette führt zum gleichzeitigen Aufbau eines Protonengradienten, der vom Komplex V zur ATP Synthese genutzt wird. (Abb. modifiziert nach Seelert et al. [143])

2.5.2 Das mitochondriale Membranpotenzial

Durch die oxidative Phosphorylierung wird ein elektrochemischer Protonengradient (protonenmotorische Kraft) über die innere Mitochondrienmembran generiert (siehe Abb. 10). Dieser setzt sich aus einem elektrischen Gradienten ($\Delta\Psi_m$), auch mitochondriales Membranpotenzial (MMP) genannt, und dem pH-Gradienten (H⁺ Konzentrationsgradient, ΔpH_m) zusammen. Das MMP entsteht durch den Nettoausfluss positiv geladener Ionen und beträgt 150-180 mV, wobei die mitochondriale Matrix gegenüber dem Intermembranraum basisch ist [144]. Der pH-Gradient führt dazu, dass Protonen wieder zurück in die Matrix fließen und OH⁻ aus der Matrix transportiert werden. Dadurch wird das MMP noch weiter verstärkt [138, 139, 144].

Das MMP dient in zweifacher Weise der ATP Synthese. Zum einen wird der Protonenfluss in die Matrix für die ATP Synthese genutzt und zum anderen ist der gleichzeitige Transport von ATP aus der Matrix und der Import von ADP durch die ADP/ATP Translokase abhängig vom MMP, weil ATP eine negative Ladung mehr als ADP besitzt [137].

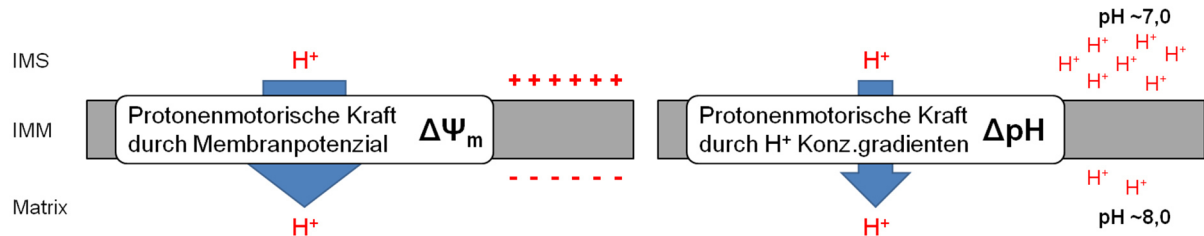


Abb. 10: Der elektrochemische Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran (IMM). Das mitochondriale Membranpotenzial (MMP, $\Delta\Psi_m$) ist ein Spannungsgradient durch den Nettofluss der Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum (IMS). Es wird durch den pH-Gradienten (ΔpH) verstärkt, indem die Protonen entlang ihres Konzentrationsgradienten wieder zurück in die Matrix fließen. (Abb. erstellt nach Alberts et al. [138])

2.5.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind Sauerstoffderivate (Radikale oder oxidierte Agenzien) [145], die unter physiologischen Bedingungen in der Zellsignalübertragung durch Beeinflussung des Redox-Zustandes von Signalproteinen involviert sind. Sie entstehen hauptsächlich als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung durch partielle Reduktion von molekularem Sauerstoff (siehe Abb. 11) [140, 145]. Durch eine vermehrte Produktion von ROS und/oder durch eine verringerte Konzentration an Antioxidantien entsteht oxidativer Stress, wodurch Lipide, Proteine, Kohlenhydrate sowie Nukleinsäuren oxidativ modifiziert und Signalwege an- bzw. abgeschaltet werden. Dies führt zum Beispiel zu Mutationen in der mitochondrialen DNA (mtDNA), die sich auf die Proteinbiosynthese und somit auch auf die ATP Synthese auswirken können. Für diese oxidativen Modifikationen sind hauptsächlich das Superoxidradikalanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyradikal (OH^{\cdot}) verantwortlich. Das Hydroxyradikal ist das reaktivste, aber auch das kurzlebigste unter den ROS, weshalb es nur biologische Makromoleküle in seiner unmittelbaren Umgebung modifizieren kann [137, 140, 145].

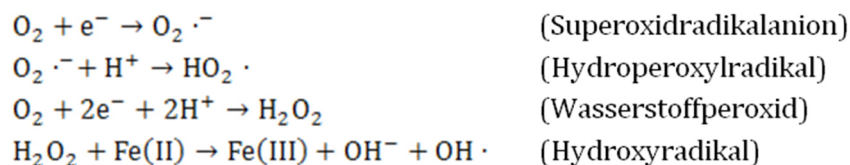


Abb. 11: Entstehung Reaktiver Sauerstoffspezies. Aus molekularem Sauerstoff entsteht durch Ein-Elektronen-Reduktion das Superoxidradikalanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und durch Zwei-Elektronen-Reduktion Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Hydrierung von $\text{O}_2^{\cdot-}$ führt zu einem Hydroperoxylradikal (HO_2^{\cdot}). H_2O_2 kann in der sogenannten Fenton Reaktion zum hoch reaktiven Hydroxyradikal (OH^{\cdot}) umgesetzt werden. (Abb. erstellt nach Scatena et al. [140])

Da die größte Menge an ROS während der oxidativen Phosphorylierung an den Atmungskettenkomplexen I, II und III entsteht, weisen Mitochondrien als Hauptangriffsstelle für ROS diverse Schutzmechanismen zur Vermeidung von oxidativem Stress auf. Zum einen verhindert die Ausbildung von Superkomplexen, dass Elektronen an den einzelnen Komplexen entweichen und zum anderen wird das hauptsächlich gebildete $O_2^{\cdot-}$ durch die mitochondriale Superoxiddismutase (SOD2) in Kombination mit einer Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff umgesetzt. Oxidativ modifizierte Mitochondrienproteine werden durch die Protease Pim-1 degradiert. DNA-Schäden (Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüche) werden durch spezielle Reparaturmechanismen behoben, wobei diese in den Mitochondrien weniger effektiv sind als im Cytosol. Phospholipasen hydrolysieren peroxidierte Lipide. [137, 140, 145].

2.5.4 Apoptose

Mitochondrien sind auch an der Initiation des programmierten Zelltodes (intrinsischer Weg) beteiligt. Die Aktivierung der Degradationsenzyme, sogenannte Caspasen, wird durch Proteine der Bcl-2 Familie stark kontrolliert, indem sie den Ausstrom von Caspaseaktivatoren aus den Mitochondrien sowohl pro- als auch antiapoptotisch regulieren [140].

Das Phospholipid Cardiolipin, das in der inneren Mitochondrienmembran vorkommt, bindet einen Anteil des Cyt c. Zu Beginn der Apoptose wirkt das cardiolipingebundene Cyt c als Peroxidase, wodurch in Anwesenheit von H_2O_2 Cardiolipin oxidiert bzw. peroxidiert wird und mit Hilfe des proapoptotischen Proteins tBid zur äußeren Mitochondrienmembran wandert. Das oxidierte Cardiolipin weist keine Affinität für Cyt c mehr auf; die Konzentration an freiem Cyt c im Intermembranraum steigt. Cardiolipin in der OMM sensibilisiert die Membran für die Rekrutierung von Bak aus dem Cytosol, dessen Oligomerisierung in der OMM zur Bildung des mitochondrialen Apoptose-induzierenden Kanals (MAC) führt [146, 147]. MAC wird dabei entweder von Bax und Bak gebildet oder die Bildung wird durch Bcl-2 und Bcl- x_L inhibiert. Alle vier Proteine gehören der Bcl-2 Familie an. Das im Intermembranraum lokalisierte Cyt c gelangt durch MAC ins Cytosol, wo es an den apoptotischen Aktivierungsfaktor 1 bindet. Gemeinsam mit ATP und der Procaspase-9 bilden sie ein Apoptosom aus, das zur Aktivierung der Caspase-9 (Initiatorcaspase) führt. Die Initiatorcaspase-9 wiederum aktiviert die Effektorcaspase-3. Effektorcaspasen vermitteln den apoptotischen Tod der Zelle, indem sie selbst aktiv am Abbau von Lamin und Aktin beteiligt sind oder sekundäre Zielproteine aktivieren.

Der programmierte Zelltod führt zu charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen: es kommt zum Schrumpfen des Cytosols, zur Chromatinkondensation, zur DNA-Fragmentierung und schließlich zum Abschnüren sogenannter *apoptotic bodies*. Ein frühes Anzeichen von Apoptose ist dabei die Verringerung des mitochondrialen Membranpotenzials induziert z.B. durch eine erhöhte Ca^{2+} Konzentration in den Mitochondrien [140].

2.6 Die Rolle der Mitochondrien bei Alzheimer Demenz

Mitochondrien sind in Synapsen konzentriert, um den hohen Energiebedarf für die synaptische Übertragung zu decken. Da A β besonders an Synapsen neurotoxisch wirkt, ist es nicht verwunderlich, dass A β Mono- und Oligomere auch in mitochondrialen Membranen gefunden wurden [148, 149]. Wie genau A β Peptide in Mitochondrien gelangen, ist jedoch noch nicht ganz geklärt. Das APP weist lediglich eine schwache Mitochondrienzielsequenz auf. In dem Zusammenhang konnte allerdings gezeigt werden, dass APP in Kontakt mit dem mitochondrialen Translokasesystem steht. Durch eine saure Domäne innerhalb der APP Sequenz (AS 220-290) kommt es wahrscheinlich zum Transmembranarrest des C-terminalen 73-kDa-Teils, wobei der C-terminus ins Cytosol ragt. Durch amyloidogene APP Prozessierung könnten so A β Peptide innerhalb des Intermembranraums entstehen, was jedoch noch experimentell bewiesen werden muss [150]. Eine andere Möglichkeit ist, dass extrazelluläres A β durch Endozytose und vesikulären Transport in die unmittelbare Nähe von Mitochondrien gelangt. Dies wurde bereits demonstriert, indem A β , das Neuroblastomzellen extrazellulär hinzugefügt wurde, in Mitochondrien lokalisiert werden konnte [151]. Darüber hinaus scheint es ebenfalls möglich, dass A β Peptide direkt von *mitochondria-associated ER membranes* (MAM) in die äußere Mitochondrienmembran übertragen werden [152]. MAM enthalten Charakteristika von *Lipid Rafts*, die eine amyloidogene APP Prozessierung begünstigen [153, 154]. Einer Hypothese zufolge penetrieren A β Oligomere Membranen, wodurch sie in Mitochondrien gelangen [155, 156]. Andere Studien sprechen von einer spezifischen Aufnahme vermittelt durch die Translokase der äußeren Mitochondrienmembran (*translocase of the OMM*, TOM), obwohl innerhalb der A β Sequenz keine Mitochondrienzielsequenz vorhanden ist. Im Fall von A β scheint die Peptidfaltung in der Membrenumgebung ausreichend für die Erkennung durch den TOM Komplex zu sein [151].

Bereits im frühen Stadium der AD kommt es zu einer abnormalen mitochondrialen Dynamik in Form von vermehrten Teilungen (*fission*) und verringerten Fusionen (*fusion*) [157, 158], was sich wiederum negativ auf die mitochondriale Biogenese auswirkt [136]. Das beeinträchtigte Gleichgewicht der mitochondrialen Dynamik wird durch veränderte Konzentrationen der Proteine, die an *fission* und *fusion* beteiligt sind, hervorgerufen und resultiert in fragmentierten Mitochondrien [159, 160]. In AD Patienten wurde bereits gezeigt, dass A β mit *dynamamin-related protein 1* (Drp1), das mit *fusion* Vorgängen assoziiert ist, interagiert [161]. Noch vor der Formierung von A β Ablagerungen konnten die beschriebenen Dysfunktionen in der mitochondrialen Dynamik und Morphologie beobachtet werden [162], was dafür spricht, dass mitochondriale Dysfunktionen zu den ersten pathogenen Veränderungen im Verlauf der AD gehören [163, 164].

Es ist denkbar, dass A β oder bereits das Vorläuferprotein APP den Proteinimport inhibiert, entweder durch direkte Interaktion mit der Importmaschinerie oder durch indirekte Mechanismen [115, 150]. Zwischen dem *voltage-dependent anion channel 1* (VDAC1) und A β wurde so eine abnormale Interaktion beobachtet, die eine Unterbrechung des Transports von Metaboliten zur Folge hatte [165]. Im Gegensatz dazu führt die Interaktion von A β mit Cyclophilin D zur Öffnung der *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) und somit zu einer erhöhten Permeabilität der IMM [166, 167]. Zudem können aber auch die mitochondrial

codierten Proteine (Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe) ursächlich für eine Dysfunktion sein, denn eine Folge des normalen Alterungsprozesses könnte die ROS-vermittelte Oxidation der mtDNA sein, die zu Mutationen führen kann [168]. Weitere A β -induzierte mitochondriale Schädigungen umfassen u.a. Defizite im α -Ketoglutarat-Dehydrogenase Komplex und im Pyruvat-Dehydrogenase Komplex (beides Enzyme des Citratzyklus), wodurch der Glucosemetabolismus gestört wird [169-171]. Der mitochondriale A β Degradationsmechanismus scheint ebenfalls beeinträchtigt zu sein. In Temporallappen von AD Patienten wurde eine geringere proteolytische Aktivität der in den Mitochondrien lokalisierten *Presequence* Protease (PreP) gefunden, wobei die Proteinkonzentration nicht herunter reguliert war. Aus diesem Grund wird vermutet, dass PreP posttranslational modifiziert wird. Die wahrscheinlichste Modifikation scheint die Oxidation induziert durch oxidativen Stress zu sein. Die proteolytische Aktivität der PreP scheint außerdem mit zunehmendem Alter abzunehmen [172].

Beim Altern scheint oxidativer Stress in den Mitochondrien von Bedeutung zu sein (für Details siehe "Theorie der Freien Radikale" und "Die mitochondriale Theorie des Alterns" [173-177]). Daher könnte es sein, dass ROS ebenfalls in der AD Pathogenese eine Rolle spielt. Mitochondriale Proteine, Lipide und DNA sind in der Tat vermehrt von (Per-)Oxidationen betroffen [178, 179]. Die Entstehung von ROS kann aber auch direkt von A β Peptiden verursacht werden. Es wurde gezeigt, dass A β Peptide in den Mitochondrien sowohl von transgenen AD Mäusen als auch von AD Patienten mit dem Enzym *amyloid- β -binding alcohol dehydrogenase* (ABAD) interagieren. Diese Interaktion verhindert die Bindung des Cofaktors NAD⁺ an ABAD, was wiederum die Generierung von ROS stimuliert [6]. Neuesten Erkenntnissen zufolge handelt es sich bei ABAD um die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 10 (17 β -HSD10) [180], dessen Konzentration in transgenen AD Mäusen und in AD Patienten erhöht ist [180-182]. Die Interaktion zwischen A β Peptiden und ABAD trägt somit zur Entstehung mitochondrialer Dysfunktionen bei.

Der Zusammenhang zwischen mitochondrialen Dysfunktionen und der AD Pathogenese ist derzeit jedoch nicht vollständig verstanden. Pathogene Veränderungen der Mitochondrien scheinen eine Konsequenz aus einem kumulativen Effekt zu sein, bei dem sich mitochondriale Dysfunktionen und A β Akkumulationen gegenseitig beeinflussen können [9].

2.7 Motivation

Die Alzheimer Demenz ist nicht nur die häufigste Form unter den Demenzerkrankungen, sondern auch die häufigste neurodegenerative Erkrankung [183]. Durch die weltweit verbesserten Lebensbedingungen steigt zwar die Lebenserwartung, aber auch die Wahrscheinlichkeit an AD zu erkranken, weil das Alter den hauptsächlichen Risikofaktor darstellt. Daher ist mit einem alarmierenden Anstieg der Krankenzahl zu rechnen, der mit enormen Kosten einhergehen wird (siehe 2.1). Zusätzlich wird es zu einer hohen sozialen Belastung für Angehörige kommen, weil drei Viertel aller Betroffenen Zuhause betreut werden [11, 12]. Aus diesem Grund ist es von besonderer Wichtigkeit, Präventionsmöglichkeiten und

Therapien zu entwickeln. Derzeit können lediglich die Symptome der AD behandelt werden, die positive Wirkung ist jedoch relativ gering.

Die ersten auf dem Markt erhältlichen Alzheimermedikamente versuchen die cholinerge Neurotransmission zu verbessern, indem das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) inhibiert wird (sogenannte AChE Hemmer). Die Therapie führt im Stadium der leichtgradigen bis mittelschweren Demenz zu einer geringfügigen Steigerung der geistigen Leistungsfähigkeit während der ersten Behandlungsmonate (nach 9-12 Monaten sinkt sie wieder auf das Ausgangsniveau ab) [184]. Bei mittelschwerer bis schwerer Demenz ist der Glutamat Antagonist Memantine indiziert. Memantine bewirkt ein langsames Fortschreiten der Krankheitszeichen durch Blockierung des NMDA Rezeptors, wodurch die Ca^{2+} Homöostase aufrecht erhalten wird [184].

Eine naheliegende Therapiemöglichkeit ist die Inhibition der β - oder γ -Sekretase zur Vermeidung der Entstehung des A β Peptids. Da β -Sekretase Inhibitoren auch andere Aspartatproteasen inhibieren [185] und die γ -Sekretase neben A β für den Metabolismus wichtige Substrate umsetzt [186, 187], ist dies allerdings keine Option. Klinische Studien zur passiven Immuntherapie mit monoklonal anti-A β Antikörpern zur Beseitigung des Peptids sind bisher aufgrund nicht signifikanter Wirksamkeit in der Phase II oder III eingestellt worden. Ein großes Problem stellt dabei die Bluthirnschranke dar, die nur von ca. 0,1% der Antikörper überwunden werden kann [188]. Die Studien zeigten aber auch, dass durch die Entfernung von A β kognitive Defizite nicht rückgängig gemacht werden können, wenn signifikanter neuronaler Schaden bereits besteht. Zukünftige Studien müssen demnach bereits bei den frühesten klinischen Symptomen oder noch davor ansetzen, um die irreversiblen Vorgänge, die zum Nervenzellsterben führen, verhindern zu können [188]. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, die molekularen Mechanismen der AD Entstehung exakt zu verstehen.

Im Verlauf der letzten zehn Jahren haben sich lösliche A β Mono- und Oligomere als die neurotoxischen Spezies des Peptids etabliert (siehe 2.3.3). Sie entstehen lange bevor sich Plaques formieren können und sind deshalb besonders in der frühen Phase der AD von großer Bedeutung. Da es vermehrt belastbare Hinweise dafür gibt, dass mitochondriale Dysfunktionen in der sehr frühen Phase der AD Pathogenese auftreten [10, 163, 164], sollen in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen von A β Mono- und Oligomeren auf diese Organellen eingehend untersucht werden. Die Untersuchungen sollen dabei fünf Teilaspekte betrachten: den A β Einfluss auf die Zellphysiologie, oxidativen Stress, den mitochondrialen Energiestoffwechsel, die mitochondrialen Membranen sowie auf das Proteom. Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle bei der Initiation des Zelltodes (siehe 2.5.4), weshalb die allgemeine Zellphysiologie in Form der Viabilität von Bedeutung ist. Da A β Peptide in den Cristae der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert zu sein scheinen [151], ist ein Einfluss des Peptids auf diese Membran, aber auch auf die in der IMM lokalisierten Atmungskettenkomplexe nicht auszuschließen. Aufgrund der Rolle von oxidativem Stress beim Altern, sind ROS auch bei der Erforschung der AD zu berücksichtigen. Proteomanalysen geben wichtige Aufschlüsse über A β -induzierte Mutationen der mtDNA und/oder der Wirkung auf Proteinimportprozesse (siehe 2.6).

Im Rahmen dieser Arbeit wird die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y als Modellsystem für die Untersuchungen verwendet (siehe 3.3.2). Diese Zelllinie wird standardmäßig für die *in vitro* Erforschung der Alzheimer Demenz eingesetzt, weil sie einige biochemische und funktionale Eigenschaften von neuronalen Zellen aufweist [189]. Als zweites Modellsystem kommt erstmalig die Ratten-Oligodendrozytenzelllinie OLN-93 zum Einsatz (siehe 3.3.1). Da Oligodendrozyten Neuronen mit Nährstoffen versorgen und das neuronale Axon mit Myelin umschließen, stehen sie in engem Kontakt zueinander, es gibt jedoch nur wenige Informationen über die A β Toxizität in Oligodendrozyten [190]. Mit fortschreitendem Alter kommt es zu Myelinabnormalitäten [191-193], die sich bei AD verschlimmern [194, 195]. Es ist allerdings nicht bekannt, ob der Schaden Teil der AD Pathogenese ist oder die Folge eines anderen pathologischen Prozesses [190]. Myelinabnormalitäten können durch axonale Degeneration hervorgerufen werden. Es ist aber auch möglich, dass A β Peptide die cholesterinreichen Membranen der Oligodendrozyten (sowie der Myelinscheide) schädigen [196-198]. Auch in Oligodendrozyten scheint es im Verlauf der AD Pathogenese zu mitochondrialen Dysfunktionen zu kommen [199]. Wegen der metabolischen Kopplung von Neuronen und Oligodendrozyten ist eine parallele Erforschung des Einflusses von A β Mono- und Oligomeren sehr sinnvoll, um die Mechanismen, die letztendlich zum Nervenzellsterben bei AD führen, aufzudecken.

3 Materialien

3.1 Geräteliste

Gerät	Hersteller
Dokumentationssysteme	
<i>Imaging</i> System LAS-3000	Fujifilm Holdings K.K., Tokio (JP)
ViewPix 900	biostep® GmbH, Jahnsdorf (D)
Elektrophoresesysteme	
SE260 Mighty Small II Deluxe Mini Vertical Electrophoresis Unit, Complete (mit Zubehör für 1,0 und 1,5 mm dicke Gele)	Hoefer Inc, Holliston (USA)
SE400 Air-Cooled Vertical Electrophoresis Unit-Complete	Hoefer Inc, Holliston (USA)
Flüssigstickstoff-Tank	
Locator 6 Plus mit Flüssig-Stickstoff Monitor	Thermo Scientific, Manetta (USA)
Gelfärbeschalen	
Gelfärbeschalen MINI, PP	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Gelfärbeschalen MIDI, PP	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Rotilabo®-Färbekammer MINI, PMP	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Rotilabo®-Färbekammer MIDI, PMP	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Glas/Teflon Potter-Elvehjem-Homogenisatoren	
Dual® 20 (1 ml)	Kontes Glass Company, Vineland (USA)
<i>tight-fit</i> Homogenisator (2 ml)	B. Braun Melsungen, Melsungen (D)
Gradientenmischer	
Gradientenmischer klein (Kammerdurchmesser 18 mm)	Mechanikwerkstatt des FB Chemie der TU Darmstadt
Gradientenmischer groß (Kammerdurchmesser 20 mm)	Mechanikwerkstatt des FB Chemie der TU Darmstadt
Halb-Mikro-Küvette	
Quarzglas SUPRASIL® Küvette Typ 109.004-QS	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim (D)
Quarzglas SUPRASIL® Küvette Typ 104F-QS	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim (D)
Laborhebebühne	
BOY 110	Rudolf Grauer AG, Degersheim (CH)
Inkubator	
Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero, Typ B 50 61 EC/O ₂	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)
Isoliergefäß	
Dewar-Gefäß nach DIN 12492	KGW-Isotherm, Karlsruher Glastechnisches Werk - Schieder GmbH, Karlsruhe (D)
Kanülen	
Kanülen mit Luer-Lock-Anschluss 1,00x200 mm	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg (D)
Kanülen mit Luer-Lock-Anschluss 1,50x100 mm	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg (D)
Kurzzeitwecker	
Rotilabo®-Signal-Timer mit Zeituhr	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)

Magnetrührer

CUV-O-STIR® Modell 333

Hellma USA, Inc, Plainview (USA)

IKAMAG® RET

IKA®-Werke GmbH & CO. KG,
Staufen (D)

MR 3001

Heidolph Instruments GmbH & Co.KG,
Schwabach (D)

RCT basic

IKA®-Werke GmbH & CO. KG,
Staufen (D)

Massenspektrometer

MALDI-TOF/TOF MS Ultraflex I

Bruker Daltonik GmbH, Bremen (D)

Mikroskope

inverses Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskop Wilovert S
(Standard PH 40 Ausstattung)

Helmut Hund GmbH, Wetzlar (D)

inverses Hellfeld-, Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskop
Axio Observer.Z1

Carl Zeiss AG, Jena (D)

inverses Konfokalmikroskop TCS SP5 II

Leica Mikrosysteme Vertrieb AG,
Wetzlar (D)

Mikrotiterplattenleser

infinite M1000

Tecan Group, Männedorf (CH)

POLARstar Galaxy

BMG Labtech GmbH, Ortenberg (D)

Mischgerät

Vortexmischer Reax 2000

Heidolph Instruments GmbH & Co.KG,
Schwabach (D)

Netzgeräte

Electrophoresis Power Supply EPS301

Amersham pharmacia biotech Europe
GmbH, Freiburg (D)

Electrophoresis Power Supply EPS601

Amersham pharmacia biotech Europe
GmbH, Freiburg (D)

Electrophoresis Power Supply EPS1001

Amersham pharmacia biotech Europe
GmbH, Freiburg (D)

pH-Messzubehör

pH-Elektrode *BlueLine* 14 pH

Schott AG, Mainz (D)

pH-Meter CG842

Schott AG, Mainz (D)

Pinzetten

Deckglas-Pinzetten (gerade und gebogen)

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)

Pipetten

100 µl 8-Kanalpipette Research®

Eppendorf AG, Hamburg (D)

300 µl 8-Kanalpipette Research®

Eppendorf AG, Hamburg (D)

PIPETMAN Classic™ P2

Gilson, Inc, Middleton (USA)

PIPETMAN Classic™ P10

Gilson, Inc, Middleton (USA)

PIPETMAN Classic™ P20

Gilson, Inc, Middleton (USA)

PIPETMAN Classic™ P100

Gilson, Inc, Middleton (USA)

PIPETMAN Classic™ P200

Gilson, Inc, Middleton (USA)

PIPETMAN Classic™ P1000

Gilson, Inc, Middleton (USA)

Pipettierhelfer

accu-jet®-pro

BRAND GMBH + CO KG, Wertheim (D)

Plasmaofen

Zepto Typ B

Diener electronic GmbH + Co. KG,
Sondheim v.d. Röhn (D)

Pumpen

Peristaltikpumpe Minipuls 3

Gilson Inc., Middleton (USA)

Transferpumpe Liquiport®

KNF Neuberger GmbH, Freiburg (D)

UNIJET II refrigerated aspirator vacuum pump

UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs
GmbH, Planegg (D)

Rührwerk

EUROSTAR digital

IKA®-Werke GmbH & CO. KG,
Staufen (D)

Schüttelapparate

Analoger Hin- und Her-Schüttler Typ 3016

Gesellschaft für Labortechnik (GFL),
Burgwedel (D)

Mikrotiterplattenschüttler DSG Titertek 1

Flow Laboratories, Inglewood (USA)

Rotationsschüttler Roto-Shake-Genie® Typ SI-1101

Scientific Industries, Inc, Bohemia (USA)

Sicherheitswerkbänke

Lamin Air HLB 2448

Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)

Lamin Air HLB 2472 BS

Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)

Spektrometer

UV-VIS-Scanning Spektrophotometer UV-2102 PC

SCHIMADZU, Kyoto (JP)

Fluoreszenzspektrometer PTI M III

Photon Technology International, Inc,
Edison (USA)

Temperiergeräte

Wasserbad RC 20

mgw Lauda, Königshofen (D)

Wasserbad KWU R

mgw Lauda, Königshofen (D)

Wasserbad Typ 1004

Gesellschaft für Labortechnik (GFL),
Burgwedel (D)

Temperier-Schüttel-Kombinationen

Kühl-Heiz-Thermomixer KTM 100 RP

Heinrich Haep HLC Haep Labor Consult,
Bovenden (D)

Vortemp Schüttelinkubator

UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs
GmbH, Planegg (D)

Transfergerät

Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell

Bio-Rad Laboratories, Inc,
Hercules (USA)

Ultraschallgerät

Sonorex TK 52 H

BANDELIN electronic GmbH & Co. KG,
Berlin (D)

Waagen

Feinwaage R 200 D

Sartorius AG, Göttingen (D)

Universalwaage U 4100 S

Sartorius AG, Göttingen (D)

Wasseraufbereitungssysteme

D4000 Distinction Water Still

Bibby Scientific Limited,
Staffordshire (UK)

Simplicity™

Merck Millipore, Billerica (USA)

Zellsortierer/Durchflusszytometer	
S3™ Cell Sorter	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules (USA)
Zellzähler	
Scepter™	Merck Millipore, Billerica (USA)
Zentrifugen und Rotoren	
Festwinkelrotor # 7588, Einsätze # 3095 und # 3103 (für 15 und 50 ml konische Röhrchen)	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)
Festwinkelrotor # 7593 (für 1,5 und 2,0 ml Reaktionsgefäße)	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)
Festwinkelrotor F 34-6-38 (für 15 und 50 ml konische Röhrchen)	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Festwinkelrotor F 45-30-11 (für 1,5 und 2,0 ml Reaktionsgefäße)	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Schwingbecherrotor # 7591, Einsätze # 7556 und # 7557 (für 15 und 50 ml konische Röhrchen)	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)
Schwingrotor für Mikrotiterplatten A-2-DWP	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Tischzentrifuge Micro V (für 1,5 und 2,0 ml Reaktionsgefäße)	Fisher Scientific, Schwerte (D)
UNIVAPO 150 H Vacuum Concentrator Centrifuge	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg (D)
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Chemilumineszenz Marker Stift	
WesternBright™ ChemiPen™	Advansta Corporation, Menlo Park (USA)
Deckgläser	
rund, 25 mm Ø, Stärke 1 (Assistent)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön (D)
Desinfektionsmittel	
Bacillol® AF	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Einfriergefäße	
Kryoröhrchen mit Innengewinde und Dichtung, 2 ml, steril	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Handschuhe	
Rotiprotect®-Latex, puderfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Rotiprotect®-Nitril, puderfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Haustanze	
Biopsie Punch, 2 mm, steril	Miltex® GmbH, Rietheim-Weilheim (D)
Immersionsöl	
Immersol 518 F fluoreszenzfrei	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen (D)
Mikrotiterplatten	
6-well Mikrotiterplatte, TC, transparent, mit Abdeckplatte, steril	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
12-well Mikrotiterplatte, TC, transparent, mit Abdeckplatte, steril	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)

Material	Hersteller
96- <i>well</i> Mikrotiterplatte, FLUOTRAC 200, F-Boden, schwarz	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
96- <i>well</i> Mikrotiterplatte, LUMITRAC 200, F-Boden, weiß	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
96- <i>well</i> Mikrotiterplatte, PS, F-Boden, transparent	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
96- <i>well</i> Mikrotiterplatte, PP, V-Boden, transparent	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
costar® 96- <i>well</i> Mikrotiterplatte, TC, schwarz, klarer F-Boden, mit Abdeckplatte, steril	Corning, Inc, Corning (USA)
Pasteurpipetten	
Einmal-Pasteurpipetten mit dünner Spitze	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Einmal-Pasteurpipetten, graduert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Pipettenspitzen	
Kapillarspitzen XL, 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf (D)
Gilson® Typ 1000 µl	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
Gilson® Typ 200 µl	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
MultiFlex®-Tips, 10-200 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Omniitip™, 10 µl	ULPLAST Sp. z o.o., Warschau (PL)
Probenteller (<i>target</i>)	
Prespotted AnchorChip (PAC) II 384/96 HCCA	Bruker Daltonik GmbH, Bremen (D)
Reagenzreservoir	
Reagenzreservoir, PP, mit Deckel, für Mehrkanal-Pipetten	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim (D)
Reaktionsgefäße	
0,2 ml Reaktionsgefäße mit flachem Deckel	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham (USA)
0,5 ml Reaktionsgefäße Multi®-SaveSeal®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
1,5 ml Reaktionsgefäße	Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel e.K., Bovenden (D)
2,0 ml Reaktionsgefäße (<i>Save-Lock</i>)	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Röhrchen	
Cellstar® 15 ml konische Röhrchen, PP, steril	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
Cellstar® 50 ml konische Röhrchen, PP, steril	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
Röhre 5ml, 75x12mm, PS (FACS-Röhrchen)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht (D)
Schläuche	
Tygon-Schlauch R3607	VWR international, Radnor (USA)
Tygon-Schlauch S3™ E-LFL	VWR international, Radnor (USA)
Sensoren	
Scepter™ Zellzähl Sensoren, 60 µm	Merck Millipore, Billerica (USA)
Serologische Pipetten	
2 ml, steril, einzeln verpackt	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)

Material	Hersteller
5 ml, steril, einzeln verpackt	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
10 ml, steril, einzeln verpackt	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
25 ml, steril, einzeln verpackt	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
Skalpell	
CUTFIX Stainless Einmalskalpell #22	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Transfermembranen	
Nitrozellulosemembran Roti®-NC	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Sequi-Blot™ PVDF Membran	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules (USA)
Verschlussfolie	
Parafilm "M"	Pechiney Plastic Packing, Inc, Chicago (USA)
Whatmanpapier	
Rotilabo®-Blottingpapiere, 1,5 mm dick	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Zellkulturflaschen	
Cellstar® Zellkulturflasche, 50 ml, 25 cm ² , Filterschraubverschluss, steril (T25-Kulturflasche)	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
Cellstar® Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm ² , Filterschraubverschluss, steril (T75-Kulturflasche)	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)
Cellstar® Zellkulturflasche, 550 ml, 175 cm ² , Filterschraubverschluss, steril (T175-Kulturflasche)	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster (A)

3.3 Zelllinien

3.3.1 OLN-93

Die Oligodendrozytenzelllinie OLN-93 wurde aus einem Tag alten Wistar Ratten generiert, indem Primärkulturen von Gliazellen des Rattenhirns *in vitro* kultiviert wurden [200]. Die in der Primärkultur enthaltenen O2A Vorläuferzellen differenzierten dabei spontan zu Oligodendrozyten (spontane Immortalisation) [200].

Bei den OLN-93 Zellen handelt es sich um eine adhärent wachsende Zelllinie, deren Wachstumsverhalten abhängig von ihrer Dichte in der Kulturflasche ist. Bei geringer Dichte sind die Zellen bipolar mit langen zellulären Fortsätzen, unter Konfluenz bilden sie große Zellklumpen, die durch lange, dünne zelluläre Fortsätze verbunden sind [200]. Die Verdopplungszeit beträgt 16-18 h [200].

OLN-93 Zellen exprimieren Galactocerebrosid, Myelin-Basisches-Protein, Myelin-assoziiertes Glycoprotein sowie Proteolipidprotein [200], die in Rattenhirnkulturen frühestens 5 Tage postnatal gefunden werden [201]. Ein weiteres charakteristisches Merkmal für primäre Oligodendrozyten sind kleine vesikuläre Membranbläschen [201], die auch in OLN-93 Zellen beobachtet werden [200]. Wie weniger differenzierte Oligodendrozyten exprimieren OLN-93 Zellen das neuronale Zelladhäsionsmolekül N-CAM/D2 in höherer Konzentration als reife Oligodendrozyten [200, 202, 203]. Außerdem sind in OLN-93 Zellen das für O2A Vorläufer-

zellen charakteristische Zelloberflächentetragangliosid A2B5 [204] sowie das für Astrozyten-typische Vimentin und Saures Gliafaserprotein abwesend [200].

OLN-93 Zellen weisen demnach morphologische Merkmale von O2A Vorläuferzellen auf, teilen sich permanent, entsprechen aber jungen, noch nicht voll differenzierten Oligodendrozyten *in vitro* [200].

3.3.2 SH-SY5Y

Bei der Zelllinie SH-SY5Y handelt es sich um den 3. Subklon von SK-N-SH Zellen [189], die aus einer Knochenmarkbiopsie einer vierjährigen Neuroblastopatientin generiert wurden [205]. Im Gegensatz zu den SK-N-SH Zellen weisen SH-SY5Y Zellen homogene neuroblasten-ähnliche Populationen auf [189]. So besitzen sie einige biochemische und funktionale Eigenschaften von neuronalen Zellen, u.a. adrenerge (moderate Dopamin- β -Hydrolase Aktivität), cholinerge und glutaminerge Charakteristika [189]. Nach Differenzierung der SH-SY5Y Zellen, z.B. durch Retinsäure, ähneln sie lebenden Neuronen im humanen Gehirn [206].

SH-SY5Y Zellen wachsen hauptsächlich adhärent in Clustern von neuroblasten-ähnlichen Zellen mit multiplen, kurzen, feinen Zellfortsätzen [207]. Aufgrund ihres Neuroblastom-ursprungs weisen sie eine verringerte Kontakthemmung auf, was zu einer Konfluenzdichte von mehr als $1,0 \times 10^6$ Zellen pro cm^2 Wachstumsfläche führt [207]. Die Verdopplungszeit beträgt 48 h [207].

3.4 Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller	Bestellnr.	Lagerung
1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	D208000	-20°C
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	9105	RT
2,6-Dichlorphenol-indophenol-natrium (DCPIP)	Fluka, Buchs (CH)	33125-25	RT
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H ₂ DCF-DA)	Molecular Probes, Eugene (USA)	D399	-20°C
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	D5905	4°C
4-Iodophenylborsäure (4-IPBA)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	471933	RT
5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-iodid (JC-1)	Enzo Life Sciences, Inc, Farmingdale (USA)	ENZ-52304	-20°C
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	D218200	RT
Aceton, techn.	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)	211007	RT
Acetonitril	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	271004	RT
Acetyl-Coenzym A Trilithiumsalz (Acetyl-CoA)	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)	A3753	-20°C

Chemikalie	Hersteller	Bestellnr.	Lagerung
Adenosin 5'-triphosphat Dinatriumsalz Hydrat (ATP)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	A3377	-20°C
alamarBlue® Cell Viability Reagent	Invitrogen AG, Carlsbad (USA)	DAL1025	4°C
Albumin Fraktion V (<i>bovine serum albumin</i> , BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	8076.2	4°C
Albumin Fraktion V (<i>bovine serum albumin</i> , BSA), fettsäurefrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	52.1	4°C
Aminocaprinsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	3113.2	RT
Amoniumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	T871.2	RT
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka, Buchs (CH)	9915	4°C
Antimycin A aus <i>Streptomyces sp.</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	A8674	-20°C
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	A4034	RT
Bernsteinsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	S9512	RT
Blei(II)nitrat	Chemikalienausgabe des FB Chemie der TU Darmstadt	k.A.	RT
Bromphenolblau	Fluka, Buchs (CH)	18030	-20°C
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	5293	RT
Carbonyl-cyanid-3-chlorophenylhydrazon (CCCP)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	C2759	-20°C
Cytochrom c aus Rinderherz (Cyt c)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	C2037	-20°C
Decylubichinon	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas (USA)	55486-00-5	-20°C
Digitonin	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)	A1905	RT
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Fluka, Buchs (CH)	60353	RT
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	A994	RT
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Fluka, Buchs (CH)	k.A.	RT
Eisen(II)chlorid Tetrahydrat	Merck KGaA, Darmstadt (D)	103861	4°C
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	3738.5	RT
Ethanol (HPLC Grade)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	P076	RT
Ethanol, techn. (EtOH)	Chemikalienausgabe des FB Chemie der TU Darmstadt	k.A.	RT
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	8043	RT
Ethylenglykol	Fluka, Buchs (CH)	3750	RT
Formaldehyd (37% in H ₂ O)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	252549	RT
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	3783	RT

Chemikalie	Hersteller	Bestellnr.	Lagerung
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	3908	RT
Imidazol	Fluka, Buchs (CH)	56750	RT
Isopropanol	Chemikalienausgabe des FB Chemie der TU Darmstadt	k.A.	RT
jetPRIME® Transfektionsreagenz	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen (D)	13-114-15	4°C
Kaliumacetat	Fluka, Buchs (CH)	60034	RT
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	6781	RT
Kaliumcyanid (KCN)	Fluka, Buchs (CH)	60178	RT
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	3904	RT
Kaliumhexacyanidoferrat (III)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	244023	RT
Kaliumhydroxid (KOH)	Fluka, Buchs (CH)	60370	RT
Luminol	Fluka, Buchs (CH)	9253	RT
LysoTracker® Red DND-99 (LTR)	Invitrogen AG, Carlsbad (USA)	L7528	-20°C
Magnesiumnitrat-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	63087	RT
Malonsäure	Fluka, Buchs (CH)	64511	RT
Methanol, techn.	Chemikalienausgabe des FB Chemie der TU Darmstadt	k.A.	RT
MitoTracker® Red CM-H ₂ XROS (MTR)	Invitrogen AG, Carlsbad (USA)	M7513	-20°C
N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	T0377	RT
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	T9281	4°C
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	A135	RT
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	3957	RT
Natriumdodecylsulfat, <i>ultra pure</i> (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	2326	RT
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	6771	RT
Natriumphosphat-Dodecahydrat (Na ₃ PO ₄ · 12 H ₂ O)	Fluka, Buchs (CH)	71909	RT
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt (D)	6516.0500	RT
Neutralrot	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	N4638	4°C
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	4421	4°C
Oxalessigsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	4126	4°C
Pierce® Protein-free T20 (PBS) Blocking Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham (USA)	37573	4°C
Ponceau S	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	P3504	RT

Chemikalie	Hersteller	Bestellnr.	Lagerung
Protease Inhibitor Cocktail (PIC) für Extrakte aus tierischen Zellen und Geweben	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	P8340	-20°C
Rotenon	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	R8876	-20°C
Roti®-Block (10x-Konzentrat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	A151	4°C
Roti®-Blue (5x-Konzentrat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	A152	RT
Roti®-Nanoquant (5x-Konzentrat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	K880	4°C
Rotiphorese® Gel 40 (19:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	3030	4°C
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	A515	4°C
Rotiphorese® Gel A	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	3037	4°C
Rotiphorese® Gel B	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	3039	4°C
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	4621	RT
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	4625	RT
SERVA Blue G (Coomassie-Brilliantblau G250)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)	35050	RT
Silbernitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	7908	RT
Staurosporin	Cell Signaling Technology, Cambridge (USA)	9953S	-20°C
SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (SYPRO® Ruby Färbelösung)	Life Technologies, Carlsbad (USA)	S21900	RT
Tetrahydrofuran (THF)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	6788	RT
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	P088	RT
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	4855	RT
Trypsin (<i>mass spectrometry grade</i>)	Promega Corporation, Fitchburg (USA)	V5280	-20°C
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	9127	RT
Wasserstoffperoxid, 30% (H ₂ O ₂)	Merck KGaA, Darmstadt (D)	107209	4°C
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	4227.1	RT
β-Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert (NADH)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis (USA)	N6005	-20°C

3.5 Zellkulturbedarf

Für die Zellkultur benötigten Medien und Lösungen werden steril vom Hersteller geliefert.

Medium/Lösung	Hersteller	Bestellnr.	Lagerung
Fetal Bovine Serum Gold (FBS)	PAA Laboratories, Pasching (A)	A15-151	-20°C
Genticindisulfat (G418) Lösung (50 mg/ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)	CP11	4°C
Gibco® Advanced Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEN)	Life Technologies, Carlsbad (USA)	12491	4°C
Gibco® Dulbecco's modified Eagle's medium ohne Phenolrot (DMEN ohne Phenolrot)	Life Technologies, Carlsbad (USA)	31053	4°C
Gibco® Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), ohne Calcium und Magnesium	Life Technologies, Carlsbad (USA)	14190	RT
Gibco® L-Glutamin (L-Gln, 200 mM)	Life Technologies, Carlsbad (USA)	25030	-20°C
Gibco® Penicillin-Streptomycin (P/S, 5000 U/ml)	Life Technologies, Carlsbad (USA)	15070	-20°C
Gibco® Trypsin-EDTA (0.05%), <i>phenol red</i>	Life Technologies, Carlsbad (USA)	25300	-20°C

3.6 Proteinmassenstandards

Name	Hersteller	Bestellnr.	Lagerung
Amersham™ HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis (HMW)	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)	17-0445-01	-20°C
Amersham™ LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (LMW)	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)	17-0446-01	-20°C
MagicMark™ XP Western Protein Standard (MM)	Invitrogen AG, Carlsbad (USA)	LC5602	-20°C
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (PR)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham (USA)	26619	-20°C
Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder (LRL)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham (USA)	26628	-20°C

3.7 Peptide

Peptid	Hersteller	Bestellnr.	Lagerung
Amyloides-β 1-42 Peptid (Aβ ₁₋₄₂), lyophilisiert	INNOVAGEN AB, Lund (SWE)	SP-BA42-1	-20°C
Amyloides-β 42-1 Peptid (Aβ ₄₂₋₁), lyophilisiert	INNOVAGEN AB, Lund (SWE)	SP-BA42R-1	-20°C
N-terminal FITC markiertes amyloides-β 1-42 Peptid (FITC-Aβ ₁₋₄₂), lyophilisiert	American Peptide Company, Inc, Sunnyvale (USA)	62-0-82A	-20°C

3.8 Plasmid

Das verwendete Plasmid wurde von der AG Meckel - Membrane Dynamics - zur Verfügung gestellt.

Plasmid	Hersteller	Verwendung	Lagerung
pTagBFP-mito	Evrogen Joint Stock Company, Moskau (RUS)	Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien	-20°C

3.9 Antikörper

3.9.1 Primäre Antikörper

Name	Klonalität	Hersteller	Bestellnr.	Lagerung
Anti-Hsp60 antibody	polyklonal	Abcam plc, Cambridge (UK)	ab46798	-20°C
Rabbit anti NDUFS1 Polyclonal antibody	polyklonal	Proteintech Group, Inc, Chicago (USA)	124444-1-AP	-20°C
Mouse-anti-OxPhos Complex V subunit alpha	polyklonal	Molecular Probes, Eugene (USA)	459240	-80°C
Anti-ATPB antibody	monoklonal	Abcam plc, Cambridge (UK)	ab14730	-20°C
Mouse anti Human Amyloid beta 8G7	monoklonal	Acris Antibodies, Inc., San Diego (USA)	AM00003 PU-N	-20°C
Anti-MTCO1 antibody	monoklonal	Abcam plc, Cambridge (UK)	ab14705	4°C
Anti-SDHA antibody	monoklonal	Abcam plc, Cambridge (UK)	ab14715	4°C
Anti-UQCRC2 antibody	monoklonal	Abcam plc, Cambridge (UK)	ab14745	4°C
VDAC1 (C-20)	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas (USA)	sc-8829	4°C

3.9.2 Sekundäre Antikörper

Name	Klonalität	Hersteller	Bestellnr.	Lagerung
Donkey anti-mouse IgG-HRP	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas (USA)	sc-2318	4°C
Donkey anti-goat IgG-HRP	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas (USA)	sc-2317	4°C
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas (USA)	sc-2033	4°C

3.10 Gase

Gas	Herkunft	Lagerung
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	Chemikalienausgabe des FB Chemie der TU Darmstadt	RT
Stickstoff (N ₂)	Chemikalienausgabe des FB Chemie der TU Darmstadt	RT

3.11 Kits

Name	Hersteller	Bestellnr.	Applikation	Lagerung
Annexin V Apoptosis Detection Kit	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas (USA)	sc-4252 AK	Apoptose/Nekrose Bestimmung	4°C
Complex I Enzyme Activity Microplate Assay Kit	Abcam plc, Cambridge (UK)	ab109721	CI Aktivitätstest	4°C
Luminescent ATP Detection Assay Kit	Abcam plc, Cambridge (UK)	ab113849	ATP Bestimmung	4°C
OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit	Millipore Corporation, Billerica (USA)	S7150	Bestimmung oxidiert Proteine	4°C

3.12 Puffer und Lösungen

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Puffer und Lösungen werden mit destilliertem entionisiertem Wasser (dest. VE-Wasser) angesetzt, es wird technisches Methanol bzw. Ethanol verwendet und der entsprechende pH-Wert wird, sofern nicht anders angegeben, mit HCl oder NaOH eingestellt.

Name	Zusammensetzung		Lagerung
2D-BN/SDS-PAGE			
2D-Anodenpuffer (pH 8,9)	100 mM	TRIS	4°C
2D-Kathodenpuffer	100 mM	TRIS	4°C
	100 mM	Tricin	
	0,05% (w/v)	SDS	
3x 2D-Sammelgelpuffer (pH 8,5)	3,0 M	TRIS	RT
	0,15% (w/v)	SDS	
3x 2D-Trenngelpuffer (pH 8,5)	3,0 M	TRIS	RT
	0,15% (w/v)	SDS	
	30% (v/v)	Glycerin	
Denaturierungspuffer	1,0% (w/v)	SDS	-20°C
	1,0% (v/v)	β-Mercaptoethanol	

Aktivitätstests			
0,2% Triton X-100/200 mM TRIS (pH 8,0)	0,2% (v/v)	Triton X-100	4°C
	200 mM	TRIS	
20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0)	20 mM	Kaliumhydrogenphosphat	4°C
	20 mM	Kaliumdihydrogenphosphat	
100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0)	100 mM	Kaliumhydrogenphosphat	4°C
	100 mM	Kaliumdihydrogenphosphat	
Aktivitätsteststopplösung (für CI und CIV)	10% (v/v)	Essigsäure	RT
	50% (v/v)	Methanol	
CI Aktivitätstestlösung (pH 7,4)	100 mM	TRIS	-20°C
	768 mM	Glycin	
	0,49 mM	NBT	
	0,1 mM	NADH	
CIV Aktivitätstestlösung (pH 7,2)	50 mM	Natriumphosphat	-20°C
	25 µM	Cytochrom c, bovine heart	
	1,58 mM	DAB	

Name	Zusammensetzung		Lagerung
CV Hydrolyseaktivitätstestlösung	35mM	TRIS	-20°C
	270 mM	Glycin	
	14 mM	Magnesiumnitrat	
	0,1% (w/v)	Bleinitrat	
	4,0 mM	ATP	
CV Hydrolyseaktivitätsteststopplösung	50% (v/v)	Methanol	RT
BN-PAGE			
3x BN-Gelpuffer oben	75 mM	Imidazol	4°C
(pH 7,0)	1,5 M	Aminocaprinsäure	
3x BN-Gelpuffer unten	75 mM	Imidazol	4°C
(pH 7,0)	1,5 M	Aminocaprinsäure	
	60% (v/v)	Glycerin	
BN-Anodenpuffer	25 mM	Imidazol	4°C
(pH 7,0)			
BN-Kathodenpuffer	7,5 mM	Imidazol	4°C
(B-Puffer)	50 mM	Tricin	
	0,02% (w/v)	Serva <i>Blue G</i>	
BN-Kathodenpuffer	7,5 mM	Imidazol	4°C
(B:10-Puffer)	50 mM	Tricin	
	0,002% (w/v)	Serva <i>Blue G</i>	
Färbemethoden			
1x Roti®-Blue Färbelösung	20% (v/v)	Methanol	RT
(Coomassiefärbung)	20% (v/v)	5x Roti®-Blue	
Roti®-Blue Entfärbelösung	25% (v/v)	Methanol	RT
(Coomassiefärbung)			
Färbelösung (Silberfärbung)	60 g/l	Natriumcarbonat	keine
	0,05 g/l	Natriumthiosulfat	
	5,0%(v/v)	Formaldehyd (37%ig)	
Fixierer I (Silberfärbung)	50% (v/v)	Methanol	RT
	12% (v/v)	Essigsäure	
Fixierer II (Silberfärbung)	50% (v/v)	Ethanol	RT
Lagerlösung (Silberfärbung)	1,0% (v/v)	Essigsäure	keine
Sensitizer (Silberfärbung)	200 mg/ml	Natriumthiosulfat	keine
Silberlösung (Silberfärbung)	2,0 g/l	Silbernitrat	keine
	0,075/ (v/v)	Formaldehyd (37%ig)	
Stopplösung (Silberfärbung)	10% (v/v)	Essigsäure	keine
Ponceau S Färbelösung	0,1% (w/v)	Ponceau S	4°C
	5,0% (v/v)	Essigsäure	
SYPRO® <i>Ruby</i> Fixierlösung	7,0% (v/v)	Methanol	
	10% (v/v)	Essigsäure	
Generierung von Zelllysaten			
20 mM Kaliumphosphatpuffer	20 mM	Kaliumhydrogenphosphat	4°C
(MilliQ-Wasser, pH 7,5)	20 mM	Kaliumdihydrogenphosphat	
Isolierung von Mitochondrien			
Homogenisierungspuffer	10 mM	HEPES	-20°C
(MilliQ-Wasser, pH 7,4, für PAGE)	1,1 mM	EDTA	

Name	Zusammensetzung		Lagerung
TRIS-Homogenisierungspuffer (MilliQ-Wasser, pH 7,4, für in-Lösung Aktivität)	10 mM	TRIS	4°C

Massenspektrometrie			
Trypsinarbeitslösung	5 ng/µl 2% (v/v) 25 mM	Trypsin Acetonitril Ammoniumhydrogencarbonat	keine

Neutralrot-Aufnahmetest			
Neutralrot-Entfärbelösung	50% (v/v) 1,0% (v/v)	Ethanol Essigsäure	RT

OxyBlot™			
12% SDS-Lösung	12% (w/v)	SDS	RT
BSA-Blockpuffer	1,0% (w/v)	BSA/1x PBS-T	keine
Puffer für Positivkontrolle (pH 7,2)	25 mM 25 mM 100 µM	HEPES Ascorbinsäure FeCl ₃	RT
Dialysepuffer	50 mM 1,0 mM	HEPES EDTA	RT

Proteinkonzentrationsbestimmung			
1x Roti®-Nanoquant (Bradford-Reagenz)	20% (v/v)	5x Roti®-Nanoquant	

ROS Test			
H ₂ DCF-DA Arbeitslösung	25 µM 5,0% (v/v)	H ₂ DCF-DA FBS/DPBS	4°C

SDS-PAGE			
4x SDS-Probenauftragspuffer (pH 6,8, MilliQ-Wasser)	300 mM 84 mM 60% (v/v) 0,004% (w/v) 30% (v/v)	TRIS SDS Glycerin Bromphenolblau β-Mercaptoethanol	-20°C
4x TRIS-Glycin-Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M	TRIS	RT
8x TRIS-Glycin-Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1,0 M	TRIS	RT
TRIS-Glycin-Laufpuffer	400 mM 50 mM 0,1% (w/v)	Glycin TRIS SDS	RT
TRIS-Tricin-Gelpuffer (pH 8,45)	3,0 M 0,4% (w/v)	TRIS SDS	RT
TRIS-Tricin-Laufpuffer	100 mM 100 mM 0,1% (w/v)	TRIS Tricin SDS	RT

Solubilisierung mitochondrialer Membranproteine			
1,11x Solubilisierungspuffer (MilliQ-Wasser, für Zellkulturen)	33,33 mM 166,67 mM 11,11% (w/v)	HEPES (pH 7,4) Kaliumacetat Glycerin	-20°C

Name	Zusammensetzung		Lagerung
2x Solubilisierungspuffer (MilliQ-Wasser, für BHM)	60 mM	HEPES (pH 7,4)	-20°C
	300 mM	Kaliumacetat	
	20% (w/v)	Glycerin	

Western Blot			
4-IPBA-ECL Lösung	10 mM	TRIS (pH 8,8)	keine
	1,25 mM	Luminol	
	2,0 mM	4-IPBA	
	5,3 mM	H ₂ O ₂	
10x PBS (Waschpuffer)	2,0 g/l	Kaliumchlorid	RT
	2,0 g/l	Kaliumdihydrogenphosphat	
	80 g/l	Natriumchlorid	
	11,5 g/l	Natriumhydrogenphosphat	
10x PBS-T (Waschpuffer)	2,0 g/l	Kaliumchlorid	RT
	2,0 g/l	Kaliumdihydrogenphosphat	
	80 g/l	Natriumchlorid	
	11,5 g/l	Natriumhydrogenphosphat	
	10 g/l	Tween® 20	
Blockpuffer	10% (v/v)	10x Roti®-Block	keine
Stripping Puffer (mild) (pH 2,2)	200 mM	Glycin	RT
	0,1% (w/v)	SDS	
	1,0% (v/v)	Tween® 20	
Towbin Puffer	192 mM	Glycin	RT
	25 mM	TRIS	
	20% (v/v)	Methanol	

3.13 Stammlösungen

Sofern nicht anders angegeben werden alle Stammlösungen mit MilliQ-Wasser angesetzt.

	Zusammensetzung der Stammlösung		Lagerung
Aktivitätstests (in-Lösung)	10 mM	Acetyl-CoA	-20°C
	400 mM	Bernsteinsäure	-20°C
		(pH 7,4, 3 M KOH)	
	50 mg/ml	BSA (fettsäurefrei)	-20°C
	0,015 % (w/v)	DCPIP	-20°C
	10 mM	Decylubichinon/DMSO	-20°C
	10 mM	DTNB/EtOH	-20°C
	10 mM	KCN	keine
	1,0 M	Malonsäure	4°C
	10 mM	Oxalessigsäure	-20°C
	1,0 mM	Rotenon/DMSO	-20°C
Fluoreszenzanisotropie	2,0 mM	DPH/THF	-20°C
Isolierung von Mitochondrien	2,0 M	Saccharose	-20°C

	Zusammensetzung der Stammlösung		Lagerung
Massenspektrometrie	25 mM	Ammoniumhydrogencarbonat	keine
	50% (v/v)	Acetonitril/25 mM Ammoniumhydrogencarbonat	keine
	30 mM	Kaliumhexacyanidoferrat (III)	keine
	100 mM	Natriumthiosulfat	keine
	1,0% (v/v)	Trifluoressigsäure	keine
Mitochondriales Membranpotenzial	20 mM	CCCP/DMSO	-20°C
	1,0 mM	JC-1/DMSO	-20°C
	1,0 mM	MitoTracker®/DMSO	-20°C
Neutralrot-Aufnahmetest	4,0 mg/ml	Neutralrot/DPBS	RT
Polyacrylamidgelelektrophoresen	10% (w/v)	APS	-20°C
	20% (w/v)	SDS	RT
Proteinkonzentrationsbestimmung	400 µg/ml	BSA	-20°C
ROS Test	20 mM	Antimycin A/EtOH	-20°C
	10 mM	H ₂ DCFH-DA/DMSO	-20°C
Solubilisierung	10 % (w/v)	Digitonin	keine
Western Blot	90 mM	4-IPBA/DMSO	RT
	250 mM	Luminol/DMSO	RT
	1,0 M	TRIS (pH 8,8)	4°C

3.14 Medien und Puffer für die Zellkultur

Die im Labor hergestellten Medien und Puffer werden unter sterilen Bedingungen gemischt und ausschließlich unter der Sterilbank verwendet.

Name	Zusammensetzung		Lagerung
DMEM-Vollmedium	10% (v/v)	FBS	4°C
	2,0% (v/v)	L-Gln	
	1,0% (v/v)	P/S	
		in advanced DMEM	
DMEM-Vollmedium ohne Phenolrot	10% (v/v)	FBS	4°C
	2,0% (v/v)	L-Gln	
	1,0% (v/v)	P/S	
		in DMEM ohne Phenolrot	
Einfriermedium	10% (v/v)	DMSO/DMEM-Vollmedium	4°C
FBS-Puffer	5,0% (v/v)	FBS/DPBS	4°C

3.15 Software

Software	Version	Hersteller	Applikation
Axio Vision	4.8.2 SP1	Carl Zeiss AG, Jena (D)	Bedienung des Mikroskops Axio Observer.Z1
Compass	1.3	Bruker Daltonik GmbH, Bremen (D)	MS Software
Delta2D	4.3	DECODON GmbH, Greifswald (D)	quantitative mitochondriale Proteomuntersuchung
Epson Scan	3.81DE	biostep® GmbH, Jahnsdorf (D)	Bedienung des Scanners ViewPix 900
FeliX	1,42	Photon Technology International, Inc, Edison (USA)	Bedienung des Fluoreszenz- spektrometers PTI M III
FLUOstar-control	4.21-0	BMG Labtech GmbH, Ortenberg (D)	Bedienung des Mikrotiter- plattenlesers POLARstar Galaxy
GIMP 2	2.8.14	Das GIMP-Team	Bildbearbeitung
i-control	1.9.17.0	Tecan Group, Männedorf (CH)	Bedienung des Mikrotiter- plattenlesers infinite M1000
ImageJ	1,49	Wayne Rasband, NIH (USA)	Bildbearbeitung, Quantifizierung von Oxyblots
ImageJ 2	k.A.	Johannes Schindelin, Albert Cardona, Mark Longair, Benjamin Schmid et al.	Bildbearbeitung
Kaluza®	1.3	Beckman Coulter, Brea (USA)	Analyse durchflussszyometrischer Daten
LAS X	1.9	Leica Camera AG, Wetzlar (D)	Bildbearbeitung
LAS-3000	2.1	Fujifilm Holdings K.K., Tokio (JP)	Bedienung des Imaging Systems LAS-3000
LAS-AF	2,6	Leica Camera AG, Wetzlar (D)	Bedienung des Konfokal- mikroskopes TCS SP5 II
Mascot search engine	-	Matrix Science Inc, Bosten (USA)	Suchmaschine für Peptidmassenfingabdruck
MDL ISIS™/Draw	2.5	MDL Information Systems, Inc, San Leandro (USA)	Zeichnen von Strukturformeln
ProSort™	1.1	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules (USA)	Bedienung des S3™ Cell Sorters
ProteinScape	3.1	Bruker Daltonik GmbH, Bremen (D)	Bioinformatikplattform für die Analyse von Proteomdaten
Real Statistics Resource Pack	3.5.1	Charles Zaiontz	Statistik
UniProt (<i>universal protein resource</i>)	-	UniProt Consortium	Bioinformatische Datenbank für alle Lebewesen und Viren
UV-2102/3102 PC	3.0	SCHIMADZU, Kyoto (JP)	Bedienung des UV-VIS- Scanning Spektrophotometers UV-2102 PC

4 Methoden

4.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgt *in vitro* unter sterilen Bedingungen entweder in Zellkulturflaschen oder in Mikrotiterplatten mit 6 oder 12 Kavitäten (ungeladene, hydrophobe Wachstumsfläche) bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂/atmosphärische Luft in einem Brutschrank mit 37°C. Als Anzuchtmedium wird advanced DMEM-Medium verwendet, dem 10% FBS, 2% L-Gln und 1% P/S frisch zugesetzt werden, wodurch es alle essentiellen Nährstoffe (u.a. Glucose, Aminosäuren, Vitamine, Hormone, Wachstumsfaktoren und Salze) enthält, die die Zellen zum Wachstum benötigen. Das in der Umgebungsluft enthaltene CO₂ dient zusammen mit dem im Medium enthaltenen Natriumhydrogencarbonat zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes [208, 209].

4.2 Subkultivierung adhärenter Zelllinien

Ist eine Zelldichte von ca. 70-80% (70-80% Konfluenz) auf der Wachstumsfläche des Kulturgefäßes erreicht, müssen die Zellen subkultiviert werden, um eine Verringerung der Proliferationsrate durch Nährstoffmangel und pH-Schwankungen, die schlussendlich zum Absterben der Kultur führen würden, zu vermeiden. Subkultivierung bedeutet, dass die Zellen aus dem Monolayer herausgelöst, in Suspension gebracht (auch Ernten genannt) und in entsprechender Verdünnung in ein neues Kulturgefäß überführt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Zellen enzymatisch mit Trypsin-EDTA von der Wachstumsfläche abgelöst. Trypsin wirkt auf die Zell-Matrix-Verbindung durch die Hydrolyse der Peptidbindung am Carboxylende der Aminosäuren Lysin und Arginin, EDTA komplexiert zweiwertige Metallionen wie Mg²⁺ und Ca²⁺, wodurch Zell-Zell-Verbindungen gelöst werden. [208, 209].

Die für die Subkultivierung benötigten Medien und Lösungen werden vor der Verwendung auf 37°C erwärmt. Zunächst wird das DMEM-Vollmedium entfernt und der Zellrasen mit DPBS gewaschen. Anschließend wird Trypsin-EDTA ins Kulturgefäß gegeben, auf dem gesamten Zellrasen verteilt und wieder abgenommen. Nach einer 5-minütigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C werden die abgelösten Zellen in DMEM-Vollmedium resuspendiert und entsprechend der gewünschten Verdünnung in neue Kulturgefäße überführt.

Um sicherzustellen, dass die Zellen gesund sind, werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien maximal 19x subkultiviert. SH-SY5Y Zellen verlieren nach 20 Passagen ihren neuronalen Charakter [207] und OLN-93 Zellen werden ab Passage 30 seneszent [210].

4.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl ist u.a. für die Beurteilung des Wachstumsverhaltens der Zellen von Bedeutung. Dabei gibt es zwei verschiedene Methoden: optisch- und elektrisch-basierte Zellzählung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird das elektronische Zählgerät Scepter™

verwendet, um ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit sicherzustellen. Der Scepter™ arbeitet nach dem Widerstandsprinzip. 50 µl der Zellsuspension in isotoner Elektrolytlösung werden in den Sensor eingezogen, wo jede einzelne Zelle eine Widerstandserhöhung generiert, die wiederum zu einem messbaren Anstieg der Spannung führt. Signale gleicher Größe werden in einem Histogramm zusammengefasst, anhand dessen die Zellzahl pro ml Suspension abzulesen ist [208, 211].

Für die Zellzahlbestimmung werden die Zellen zunächst von ihrer Wachstumsfläche abgelöst (siehe 4.2) und in DPBS resuspendiert (Arbeitsvolumen des Kulturgefäßes). Abhängig vom Konfluenzgrad der Kultur wird eine 1:3 bis 1:6 Verdünnung der Zellsuspension mit DPBS hergestellt (Endvolumen 200-300 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß). Diese Verdünnung wird für die Zellzählung mittels Scepter™ nach Angaben des Herstellers [212] verwendet. Durch die Multiplikation der erhaltenen Zellzahl pro ml mit dem Verdünnungsfaktor und dem Gesamtvolumen der Zellsuspension im Kulturgefäß wird die Gesamtzellzahl erhalten.

4.4 Kryokonservierung

Das Einfrieren und das zeitlich unbefristete Lagern von Zellen unterhalb von -130°C wird Kryokonservierung genannt. Dafür wird den Zellen eine Gefrierschutzsubstanz (Kryoprotektivum, z.B. DMSO) zugesetzt, um Zellschäden durch die beim Einfrierprozess entstehenden Eiskristalle zu verringern. Erst bei Temperaturen unter -130°C kommen die meisten zellulären Prozesse zum Erliegen und bei -196°C findet keinerlei Stoffwechselaktivität mehr statt [209]. Prinzipiell werden kultivierte Zellen mit einer eher geringen Kühlrate (-1°C/min) eingefroren, wodurch die Bildung großer, intrazellulärer Eiskristalle verhindert wird, die Zellen aber dehydrieren, was zu einer sehr hohen Konzentration an Elektrolyten führt. Kryoprotektiva verzögern diese osmotische Dehydrierung aufgrund ihrer Penetration in die Zellen [209].

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Zellen, die eingefroren werden sollen, zunächst von der Wachstumsfläche abgelöst (siehe 4.2) und gezählt (siehe 4.3). Anschließend werden $1,0-4,0 \times 10^6$ Zellen pro ml in Einfriermedium aufgenommen. 1 ml Aliquots werden für 15 min auf Eis, dann für 1-2 h bei -20°C und schließlich über Nacht bei -80°C eingefroren. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgt in der Gasphase über Flüssigstickstoff (-150 bis -178°C).

Beim Auftauen einer Kryokultur ist auf Schnelligkeit zu achten, weil das als Kryoprotektivum eingesetzte DMSO zelltoxisch ist [209]. Die Zellen werden in einem Wasserbad bei 37°C unter Schütteln aufgetaut. Anschließend wird die Zellsuspension in einem konischen Röhrchen mit 9 ml DMEM-Vollmedium verdünnt und für 5 min bei 700x g und RT zentrifugiert. Das verdünnte Einfriermedium wird anschließend vom Zellpellet abgenommen, die Zellen werden in frischem DMEM-Vollmedium resuspendiert und in einer T75-Kulturflasche im Brutschrank bis zur Konfluenz kultiviert.

4.5 Bestimmung der Populationsverdopplungszeit

Das Zeitintervall für die Verdopplung einer Zellzahl in einer Kultur wird Populationsverdopplungszeit genannt. Diese wird anhand einer sogenannten Wachstumskurve, für die in definierten Zeitabständen Zellzahlbestimmungen für die Kultur durchgeführt werden, ermittelt [208].

In Kavitäten von 6-well Platten (Arbeitsvolumen 3 ml) werden dafür jeweils identische Zellzahlen ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Alle 24 h werden drei Kavitäten (Dreifachbestimmung) geerntet (siehe 4.2) und gezählt (siehe 4.3). Die Erstellung der Wachstumskurve ist beendet, wenn sich die Kultur in der Plateau- bzw. Absterbephase des Wachstums befindet. Die Populationsverdopplungszeit wird anschließend für die exponentielle Wachstumsphase bestimmt, indem der Logarithmus der Zellzahl pro cm² Wachstumsfläche gegen die Zeit aufgetragen und die Steigung ermittelt wird. Zusätzlich wird zur Bestimmung der Zellmorphologie in Abhängigkeit von der Zelldichte vor jedem Ernten ein Phasenkontrastbild von den Zellen aufgenommen.

4.6 Generierung einer stabilen Zelllinie

Als Transfektion wird das Einbringen fremder DNA (über sogenannte Plasmide) in eukaryotische Zellen bezeichnet. Dies geschieht z.B. mittels kationischer Liposomen, die der DNA durch deren Komplexierung eine positive Nettoladung verleiht, wodurch eine Interaktion mit der negativ geladenen Zelloberfläche ermöglicht wird. Die zelluläre Aufnahme erfolgt wahrscheinlich durch adsorptive Endozytose. Wie die DNA aus den Endosomen in den Zellkern gelangt, ist bisher ungeklärt [209, 213].

Wenn die DNA in das Wirtsgenom integriert wird, handelt es sich um eine stabile Transfektion. Um zwischen Zellen unterscheiden zu können, die das Zielgen stabil, transient oder nicht exprimieren, enthalten die Plasmide neben dem Zielgen einen Selektionsmarker, der transfizierten Zellen eine Resistenz gegenüber eines speziellen Antibiotikums verleiht. Durch Selektion werden nach 2-3 Wochen stabil transfizierte Zellen erhalten [213].

In der vorliegenden Arbeit werden Zelllinien generiert, die stabil tagBFP-mito (siehe Tab. 3) exprimieren. Das dafür verwendete Plasmid (siehe 7.2) codiert das blau fluoreszierende Protein (tagBFP) und die mitochondriale Zielsequenz (MTS) der humanen Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIII. TagBFP ist dabei N-terminal mit der MTS fusioniert. Die Expression dieses Plasmids führt zu fluoreszenzmarkierten Mitochondrien (der Fluorophor ist in der Matrix lokalisiert).

Tab. 3: Plasmid für die stabile Transfektion von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.

Plasmid	Wirt	Reporter	Zielsequenz	Selektion
pTagBFP-mito	Säugetier	tagBFP (ex/em 402/457 nm)	mitochondriale Zielsequenz (MTS) der humanen Cytochrom- c-Oxidase Untereinheit VIII	Neomycin (G418)

Die Transfektion adhärenter Zelllinien wird von PD Dr. Tobias Meckel mit dem Transfektionsreagenz jetPRIME® nach Angaben des Herstellers [214] durchgeführt. Dafür werden Plasmid-DNA (2,5 µg) und jetPRIME® im Verhältnis von 1:2 (w/v) eingesetzt. Die Selektion beginnt ca. 24 h nach der Transfektion. Für OLN-93 Zellen wird Neomycin (G418) mit einer finalen Konzentration von 1,0 mg/ml [215] verwendet, für SH-SY5Y 500 µg/ml Neomycin [216].

4.7 Disaggregation von Aβ Peptiden

Synthetische Aβ Peptide werden nach Jao et al. [217] disaggregiert. Dafür wird das lyophilisierte Peptid mit destilliertem TFA in einem dickwandigen Reagenzglas mit Schraubdeckel gemischt (1,5 ml TFA pro 1,0 mg Peptid) und für 15 min im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wird für 15 min bei 3000x g und 16°C zentrifugiert. Wenn kein Pellet sichtbar ist, ist das Peptid vollständig gelöst und wird in ein frisches dickwandigen Reagenzglas mit Schraubdeckel überführt. Nun wird das TFA im Stickstoffstrom verdampft, bis das Aβ Peptid als wachsartiger Belag an der Glaswand zurückbleibt. Der Belag wird in DMSO gelöst, sodass Stammlösungen mit einer Konzentration von 1,0 mM für Aβ₁₋₄₂ Peptide bzw. Aβ₄₂₋₁ Peptide sowie 200 µM für fluoreszenzmarkierte Aβ₁₋₄₂ Peptide entstehen. Die disaggregierten Peptide können über mehrere Monate bei 4°C gelagert werden [217].

4.8 Applikation von Aβ Peptiden

Disaggregierte Aβ Peptide (siehe 4.7) werden in einer Endkonzentration von 2,0 µM direkt zum DMEM-Vollmedium gegeben und so mit adhärenen Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert. Kommen Mikrotiterplatten mit 6 oder 12 Kavitäten zum Einsatz, werden 16-20 h vor der Aβ Inkubation Zellen mit einer Dichte von $1,0 \times 10^5$ Zellen pro ml in jede Kavität ausgesät (siehe 4.2 und 4.3). Zellen, die in Kulturflaschen kultiviert werden, werden bei einer Konfluenz von ca. 40% mit Aβ Peptiden behandelt.

4.9 Nachweis von extern applizierten Aβ Peptiden

Im Rahmen dieser Arbeit werden Zellen mit synthetischen Aβ Peptiden behandelt (siehe 4.8), ein Nachweis über die Interaktion des Peptids mit den Zellen muss erbracht werden. Dies geschieht mittels fluoreszenzmarkiertem Aβ₁₋₄₂ Peptid (siehe 7.3), das mittels Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie visualisiert wird.

Adhärenent in einem 12-well wachsende Zellen werden für 24 h mit 1,0 µM FITC-Aβ₁₋₄₂ inkubiert. Anschließend werden die Zellen geerntet (siehe 4.2), in 400 µl DPBS aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht (siehe 4.13). Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen.

Für Lokalisationsstudien mittels Konfokalmikroskopie (siehe 4.14) werden Zellen, die stabil tagBFP-mito exprimieren (siehe 4.6), auf einem hydrophoben Deckgläschen (siehe 4.14)

ausgesät. Adhärent wachsende Zellen werden ca. 3 h bzw. ca. 16 h vor der Messung mit 200 nM FITC A β ₁₋₄₂ behandelt.

Alternativ werden adhärent auf einem hydrophoben Deckgläschen wachsende Zellen für ca. 5 h mit 200 nM FITC A β ₁₋₄₂ inkubiert. Ungefähr 10 min vor der Messung wird das DMEM-Vollmedium zusätzlich mit 10 nM LysoTracker® Red DND-99 (LTR) versetzt.

4.10 Zellviabilitätstests

4.10.1 Neutralrot-Aufnahmetest

Beim Neutralrot-Aufnahmetest handelt es sich um einen Standard-Zytotoxizitätstest, der zur Bestimmung der Zellviabilität (Anteil lebender Zellen in einer Zellpopulation) eingesetzt wird [218]. Der Farbstoff Neutralrot passiert die Zellmembran durch passive Diffusion und wird in vitalen Zellen in den Lysosomen konzentriert. Im sauren Milieu der lysosomalen Matrix wird Neutralrot zu einem Ion, das über elektrostatische und hydrophobe Bindungen an anionische Reste bindet [219, 220]. Ungebundener Farbstoff wird durch Waschen entfernt. Zur Quantifizierung des in den Lysosomen gebundenen Farbstoffes, wird er mit einer sauren Ethanol-lösung aus den Zellen extrahiert. Für die Bestimmung der Zellviabilität wird angenommen, dass die Menge des extrahierten Farbstoffes proportional zur Anzahl lebender Zellen ist [218].

Der Neutralrot-Aufnahmetest wird modifiziert nach Repetto et al. [218] durchgeführt. Die Neutralrot-Arbeitslösung (40 μ g/ml Neutralrot in serumfreiem DMEM-Vollmedium) wird über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird ungelöster Farbstoff für 10 min bei 600x g und RT sedimentiert. Adhärent in 6-wells wachsende Zellen (siehe 4.8) werden für 2 h bei 37°C im Brutschrank mit der Neutralrot-Arbeitslösung inkubiert. Anschließend werden die Zellen geerntet und gezählt (siehe 4.2 und 4.3). Es werden pro Probe $2,5 \times 10^5$ Zellen in 1,0 ml Neutralrot-Entfärbelösung aufgenommen und für 10 min bei RT geschüttelt. Anschließend werden in drei Kavitäten einer schwarzen 96-well Platte je 200 μ l der Zellsuspension (entspricht $5,0 \times 10^4$ Zellen pro Kavität) gefüllt (Triplikat). Als Leerwert (*blank*) dienen Zellen, die für 2 h mit serumfreiem DMEM-Vollmedium inkubiert werden. Die Fluoreszenz von Neutralrot (ex/em 530/645 nm) wird mit dem Mikroplattenleser infinite M1000 gemessen.

4.10.2 AlamarBlue® Test

Unter dem Handelsnamen alamarBlue® wird der blaue Redox-Farbstoff Resazurin vertrieben. Resazurin ist zellpermeabel und wird im reduzierenden Milieu des Cytosols lebender Zellen allmählich zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt (siehe Abb. 12). Da die irreversible Reduktion des Farbstoffs mit der metabolischen Aktivität einhergeht, gilt sie als Maß der Zellviabilität [221].

Der alamarBlue® Test wird als 96-well Plattenassay nach Angaben des Herstellers [221] durchgeführt. Adhärent in 6-wells (Arbeitsvolumen 3 ml) wachsende Zellen (siehe 4.8) werden in einem Verhältnis von 10:1 mit der alamarBlue® Lösung versetzt und für 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen geerntet und gezählt (siehe

Lichtausschluss inkubiert, die für die Kompensation benötigte Einzelfärbung mit 0,5 µg PI. Für die Messung werden beiden Kontrollen weitere 300 µl 1x Apoptose Assay Puffer hinzugefügt.

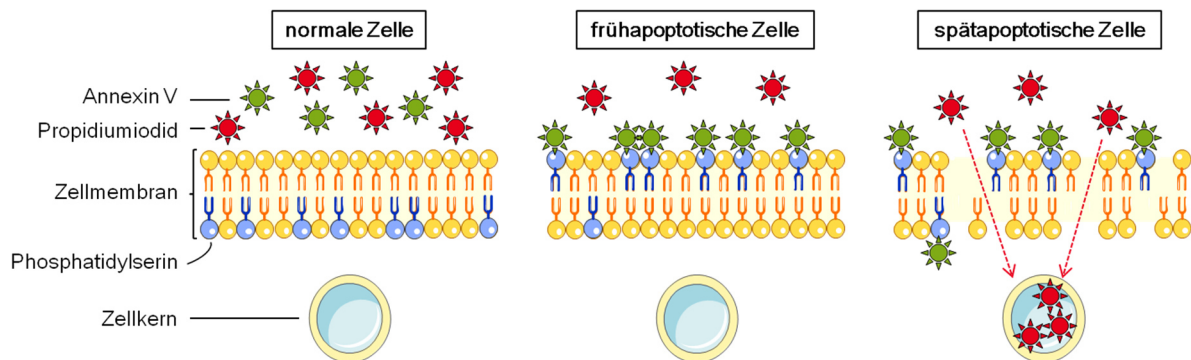


Abb. 13: Prinzip der Apoptose- und Nekrosedetektion. Vitale Zellen sind negativ für Annexin V und Propidiumiodid (PI). Frühapoptotische Zellen verlagern Phosphatidylserine (PS) auf die Zelloberfläche, wodurch sie von Annexin V detektiert werden. Die Plasmamembran in spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen verliert ihre Integrität, PI dringt in die Zelle ein und interkaliert in die DNA. (Abb. erstellt nach [226])

4.11 Nachweis Reaktiver Sauerstoffspezies

Bei dem zellpermeablen 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat ($H_2DCF-DA$) handelt es sich um eine chemisch reduzierte Form des Fluoresceins. Es wird als Indikator für ROS in Zellen eingesetzt, weil es sehr sensitiv auf intrazelluläre Redoxänderungen reagiert [227]. Der Farbstoff ist dabei spezifisch für Wasserstoffperoxid [228]. Innerhalb der Zelle werden die Acetatgruppen durch cytoplasmatische Esterasen abgespalten. Das entstandene 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein wird dann in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch Peroxidasen zum fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert (siehe Abb. 14) [229].

Es werden $2,0 \times 10^4$ Zellen pro Kavität in eine sterile schwarze 96-well Platte mit durchsichtigem Boden ausgesät und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag werden die Zellen mit DPBS gewaschen, mit ROS Arbeitslösung für 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und danach erneut gewaschen. Anschließend wird zu allen Zellen DMEM-Vollmedium ohne Phenolrot gegeben. Die Zellen werden dann mit $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{42-1}$ (jeweils 2,0 µM) oder Antimycin A (50 µM) behandelt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wird die DCF Fluoreszenz (ex/em 485/535 nm) nach dem Waschen der Zellen gemessen.

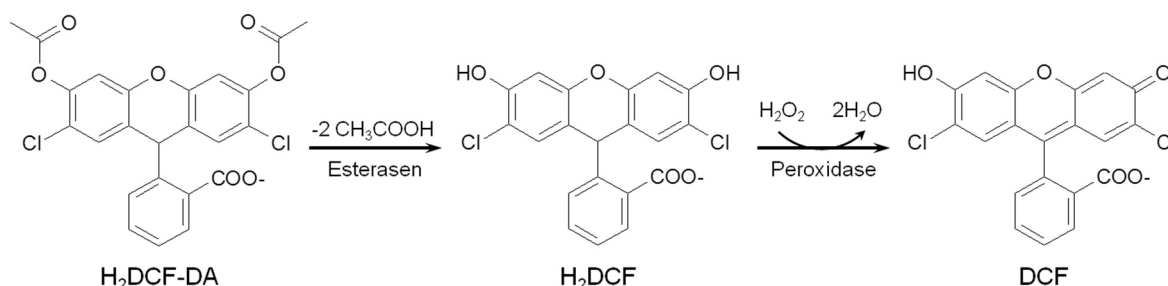


Abb. 14: Mechanismus der Detektion von Wasserstoffperoxid. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) wird intrazellulär durch Esterasen zu 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF) umgesetzt, was wiederum in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch Peroxidasen zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorodifluorescein (DCF) oxidiert wird. (Abb. erstellt nach [230])

4.12 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials

4.12.1 JC-1 Test

Das zellpermeable JC-1 akkumuliert potenzialabhängig in der Mitochondrienmatrix (siehe Abb. 15). Die monomere Form weist eine grüne Fluoreszenz ($\text{em} \sim 530 \text{ nm}$) auf. Mit zunehmendem mitochondrialem Membranpotenzial gelangen mehr JC-1 Monomere in die Mitochondrien, die konzentrationsabhängig zum sogenannten J-Aggregat akkumulieren. Durch die Formierung der J-Aggregate kommt es zu einer Fluoreszenzverschiebung von grün nach rot ($\text{em} \sim 590 \text{ nm}$) [144].

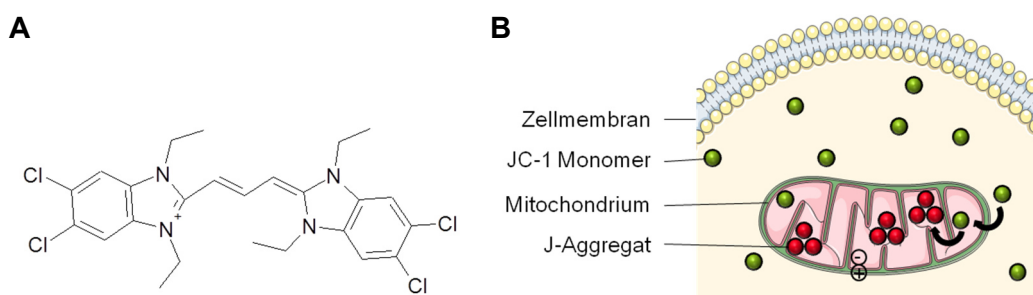


Abb. 15: Mechanismus der Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) mittels JC-1. (A) Der lipophile, kationische Farbstoff JC-1 (B) akkumuliert in der Mitochondrienmatrix abhängig vom MMP zum J-Aggregat, wodurch es zu einer Fluoreszenzverschiebung von grün ($\text{em} \sim 530 \text{ nm}$) nach rot ($\text{em} \sim 590 \text{ nm}$) kommt. (Abb. erstellt nach [231, 232])

Zunächst wird JC-1 mit einer finalen Konzentration von $5,0 \mu\text{M}$ in 5,0% (v/v) FBS/DPBS gelöst und für 5 min bei $13.000\times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird als JC-1 Arbeitslösung verwendet. Adhärenz in 12-wells wachsende Zellen (siehe 4.8) werden für 20-30 min bei 37°C im Brutschrank mit der JC-1 Arbeitslösung inkubiert, dann geerntet und für die durchflusszytometrische Messung (siehe 4.13) in $300 \mu\text{l}$ DPBS aufgenommen. Die Positivkontrolle wird im gleichen Zeitraum mit JC-1 Arbeitslösung mit einer finalen CCCP Konzentration von $100 \mu\text{M}$ behandelt (zerstört elektrochemischen Gradienten), anschließend geerntet und ebenfalls in $300 \mu\text{l}$ DPBS aufgenommen.

Für eine qualitative Analyse am Konfokalmikroskop (siehe 4.14) werden Zellen auf einem hydrophoben Deckgläschen (siehe 4.14), das sich auf dem Boden eines 6-wells befindet, ausgesät. Adhärente Zellen werden für 30 min in JC-1 Arbeitslösung (hergestellt wie oben beschrieben), inkubiert. Nach dem Waschen werden die Zellen dann am CLSM analysiert. Für die Positivkontrolle wird die JC-1 Arbeitslösung mit 100 μ M CCCP versetzt.

4.12.2 MitoTracker® Test

Der nichtfluoreszierende MitoTracker® Red CM-H₂XRos (MTR) gelangt über passive Diffusion über die Zellmembran. In vitalen Zellen wird er oxidiert und akkumuliert dann in aktiven Mitochondrien, indem er mit Thiolgruppen von Proteinen reagiert. Im oxidierten Zustand ist MTR fluoreszent.

Adhärenz in 12-wells wachsende Zellen (siehe 4.8) werden für 10 min bei 37°C im Brutschrank mit 1,0 μ M MTR inkubiert, dann geerntet und für die durchflusszytometrische Messung (siehe 4.13) in 300 μ l DPBS aufgenommen. Die Positivkontrolle wird vor der Inkubation mit MTR zunächst für 5 min mit 100 μ M CCCP behandelt (zerstört elektrochemischen Gradienten).

4.13 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen innerhalb ganzer Zellpopulationen auf der Grundlage ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften (siehe Abb. 16). Innerhalb des Durchflusszytometers befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit, in welcher die zu vermessenden Zellen in einer Suspension vereinzelt werden. Passieren die Einzelzellen den Laserstrahl, wird dieser abgelenkt und es entsteht Streulicht. Die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (*forward scatter*, FSC) gilt als Maß für die Größe der Zellen, wobei kleine Zellen weniger Licht streuen. Die 90° Lichtstreuung (*side scatter*, SSC) ist ein Maß für die "Granularität". Je mehr Streuung vorhanden ist, desto granulärer ist die Zelle. Eine exakte Unterscheidung der Subtypen einer Population gelingt allerdings nur durch die Markierung zellulärer Strukturen mit Fluorophoren. Nach der Anregung emittieren die Fluoreszenzfarbstoffe Licht definierter Wellenlänge, das im sogenannten Fluoreszenzkanal (FL) mit dem entsprechenden Filter über eine Photomultiplieröhre (*photo multiplier tube*, PMT) detektiert wird [233, 234].

Die graphische Auftragung dieser Signale erfolgt entweder in einem Dichtediagramm oder einem Histogramm. In einem Dichtediagramm entspricht jeder Punkt einer einzelnen Zelle. Es können zwei verschiedene Parameter der gemessenen Zellen aufgetragen werden. Das Histogramm stellt eine einfache Häufigkeitsverteilung dar, in dem die Fluoreszenzintensität eines Fluorophors gegen die Anzahl der Ereignisse (*count*) aufgetragen wird. Dabei entspricht jedes Ereignis einer Zelle. Innerhalb dieser Diagramme werden weiter zu untersuchende Zellpopulationen in sogenannten *Gates* markiert. Diese ausgewählten Zellen können dann in weiteren Diagrammen hinsichtlich anderer Parameter analysiert werden [233, 234].

Bei der gleichzeitigen Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe muss darauf geachtet werden, dass sich die Emissionsspektren nicht überlappen, damit es zu keinen falsch positiven

Signalen in einem Fluoreszenzkanal kommt. Lässt sich dies nicht vermeiden, wird eine sogenannte Kompensation durchgeführt. Bei der Kompensation werden falsch positive Signale von richtig positiven getrennt, indem das Programm kalkuliert, wie viel Prozent der Emission eines Fluorophors in einem Kanal vorhanden ist, in dem er nicht gemessen wird. Dieser Prozentsatz wird dann von dem Programm aus dem Kanal heraus gerechnet, sodass nur die Emission des zweiten Fluorophors in dem Kanal detektiert wird. Für diese Berechnungen ist es erforderlich, dass zusätzlich zu den Proben auch Zellen vermessen werden, die jeweils nur einen der beiden Fluorophore enthalten [233, 234].

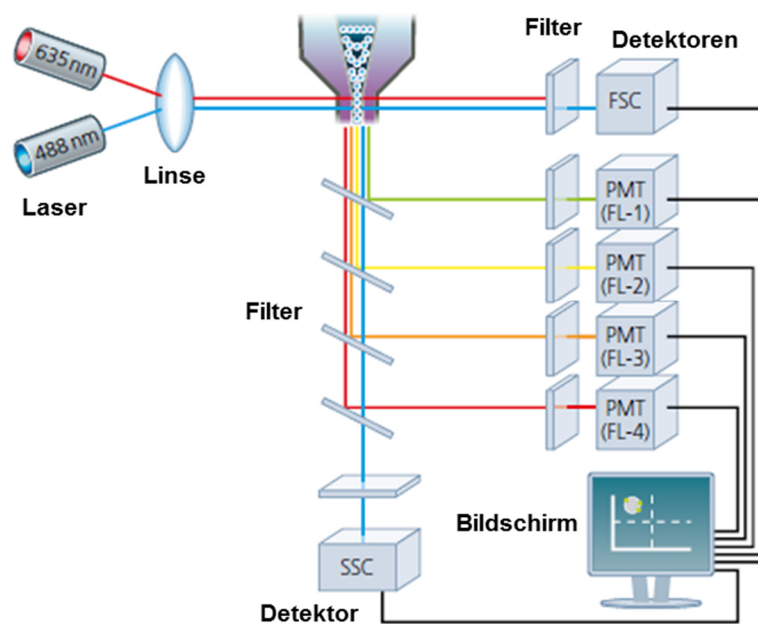


Abb. 16: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. Monochromatisches Licht der Laser trifft auf eine vereinzelte Zelle und wird von dieser gestreut. An den Detektoren wird das Streulicht parallel (FSC) und senkrecht (SSC) zum eingestrahlten Licht aufgenommen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) dient dabei als Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (SSC) als Maß für die Granularität der Zelle. Befindet sich in der Zelle ein Fluorophor, emittiert dieser Licht, das auf Photomultiplerröhren (PMT) mit unterschiedlichen Filtern trifft. Licht definierter Wellenlängen, das den Filter durchdringen kann, wird ebenfalls in ein elektrisches Signal umgewandelt. (Abb. übersetzt nach Rahman [234])

Die für die durchflusszytometrische Analyse der jeweiligen Fluorophore vorzunehmenden Einstellungen am Durchflusszytometer sind Tab. 4 zu entnehmen. Zunächst wird eine Probe vermessen, die nicht mit Fluorophoren behandelt wurde (ungefärbt). Sie dient zum einen der Festlegung der gewünschten Zellpopulation im Dichtediagramm FSC/SSC durch ein *Gate* und zum anderen der Bestimmung der Eigenfluoreszenz im Histogramm FL-x/count oder Dichtediagramm FL-x/FL-x. Anschließend werden gegebenenfalls Einzelfärbungen vermessen, um die Kompensation durchzuführen. Danach folgen die Proben und Positivkontrollen. Es werden jeweils 10.000 Zellen, die sich innerhalb des *Gates* im Dichtediagramm FSC/SSC befinden, analysiert.

Tab. 4: Fluorophore für die Durchflusszytometrie.

Fluorophor	Anregungs- und Emissions-maximum (ex/em)	Anregungslaser	Emissionsfilter
5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-iodid (JC-1)	514/529 nm (Monomer) 514/590 nm (J-Aggregat)	488 nm	FL1 (525/30 nm) FL2 (586/25 nm) FL3 (615/25 nm)
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	494/518 nm	488 nm	FL1 (525/30 nm)
MitoTracker® Red CM-H ₂ XRos (MTR)	579/599 nm	561 nm	FL2 (586/25 nm) FL3 (615/25 nm)
Propidiumiodid (PI)	535/617 nm	488 nm	FL2 (586/25 nm)

4.14 Konfokalmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie ist eine Technik zum Erhalt von hochaufgelösten, kontrastreichen Bildern. Ein Laser fällt hierfür durch eine Lochblende auf die fluoreszenzmarkierte Probe, wodurch nur ein kleiner punktförmiger Bereich (0,25-1,0 Airy Einheiten) beleuchtet wird. Das Objektiv fokussiert das emittierte Licht so auf eine Lochblende vor dem Detektor, dass der Punkt in der Mitte der Lochblende und der Belichtungspunkt in der Probe gleichzeitig im Fokus sind (sie sind konfokal zueinander). Licht von außerhalb der Fokusebene, das nur geringe Intensitäten aufweist, wird an der Lochblende fast vollständig blockiert. Dadurch werden ein hoher Kontrast sowie eine hohe Auflösung erreicht. Um ein vollständiges Bild zu erhalten, wird die Probe Punkt für Punkt abgerastert (siehe Abb. 17) [235].

Für die Konfokalmikroskopie werden adhärent auf einem runden Deckgläschen wachsende Zellen verwendet. Die Deckgläschen werden vor der Verwendung für 5 min. mit Aceton gewaschen und nach dem Trocknen im Plasmaofen behandelt (siehe Tab. 5), wodurch eine hydrophile, negative Oberflächenladung bei pH 7,2 entsteht [208]. Sie werden dann auf den Boden von Kavitäten einer 6-well Platte gelegt und die Zellen in der gewünschten Zelldichte darüber ausgesät (siehe 4.2).

Unmittelbar vor der Mikroskopie wird ein Deckgläschen mit Zellen in ein Edelstahlschälchen (Version Ein-Gewinde-ein-Dichtring) mit Pufferreservoir (Design: PD Dr. Tobias Meckel, Produktion: Mechanikwerkstatt des FB Biologie der TU Darmstadt) eingespannt. Damit die Zellen während der Messung nicht austrocknen, wird das Pufferreservoir mit 500 µl DPBS befüllt.

Die Bedienung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes (CLSM) wird von PD Dr. Tobias Meckel vorgenommen. Die Zellen werden mit dem Objektiv HCX PL APO lambda blue 63.0x1.40 OIL UV betrachtet. Nach Anregung des Fluorophors (siehe Tab. 6) erfolgt die Erstellung der Bildaufnahmen mit der Software LAS AF. Bei der gleichzeitigen Verwendung von zwei Fluorophoren wird ein sogenannter *sequential scan* durchgeführt, bei dem die Fluorophore nacheinander angeregt werden, um gegenseitige Überlappung der Emissionen zu verhindern.

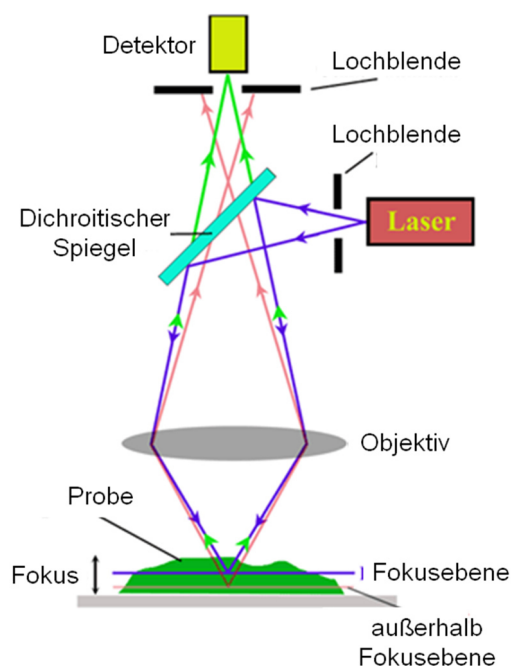


Abb. 17: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM). Ein fokussierter Laserstrahl beleuchtet nur einen kleinen Bereich der Probe, der konfokal zum Punkt in der Mitte der Lochblende vor dem Detektor ist. So erreicht nur Licht, dass sich in der Fokusebene befindet, den Detektor. Zur vollständigen Bild-darstellung muss die Probe Punkt für Punkt abgerastert (*scan*) werden. (Abb. übersetzt nach [236])

Tab. 5: Einstellungen am Plasmaofen Zepto Typ B zur Behandlung von Deckgläschen mit Sauerstoff-Plasma.

Einstellungen am Plasmaofen Zepto Typ B	
Zeit	2 min
Druck	0,6 mbar
Frequenz	40 kHz
Leistung	50 W
Prozessgas	atmosphärische Luft gesättigt mit Wasser

Tab. 6: Fluorophore für die Konfokalmikroskopie.

Fluorophor	Anregungs- und Emissions-maximum (ex/em)	Anregungslaser
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	494/518 nm	488 nm
5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenz-imidazolylcarbocyanin-iodid (JC-1)	514/529 nm (Monomer) 514/590 nm (J-Aggregat)	405/488 nm 405/488/561 nm
LysoTracker® Red DND-99 (LTR)	577/590 nm	561 nm
tag-BFP-mito	402/457 nm	405 nm

4.15 Generierung von Zelllysaten

Intakte Zellen müssen zerstört werden, um an ihre intrazellulären Bestandteile zu gelangen. In der vorliegenden Arbeit wird die sogenannte Zelllyse mechanisch mit einem Glas/Teflon Potter-Elvehjem-Homogenisator herbeigeführt, indem der drehende Kolben (elektrisch angetrieben) manuell auf- und ab bewegt wird, wodurch die Zellen zwischen Kolben und Glaswand hindurchgepresst werden und aufplatzen.

Zelllysate werden nach Spinazzi et al. [237] gewonnen. Dafür werden ca. $8,0 \times 10^6$ Zellen geerntet (siehe 4.8), für 5 min bei 1.000x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 800 µl 20 mM Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. Die Zelllyse erfolgt im eisgekühlten Glas/Teflon Potter-Elvehjem-Homogenisator, indem 15 Hübe bei 800 rpm durchgeführt werden. Anschließend wird das Lysat in Flüssigstickstoff schockgefroren und sofort wieder aufgetaut (37°C). Dieser Vorgang wird 2x wiederholt. Das Zelllysate wird dann bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

4.16 Isolierung von Mitochondrien

Um intrazelluläre Organellen wie Mitochondrien zu isolieren, müssen zunächst intakte Zellen mechanisch aufgebrochen werden (siehe 4.15). Dem so erhaltenen Zelllysate wird zum Schutz der Organellen ein Osmolyt (z.B. Saccharose) zugesetzt. Anschließend wird es durch differenzielle Zentrifugation anhand der Sedimentationsgeschwindigkeiten der einzelnen Organellen grob fraktioniert. Die mitochondriale Fraktion wird dabei durch die Zentrifugation für mind. 10 min bei mind. 10.000x g erhalten [238].

4.16.1 Isolierung von Mitochondrien für gelbasierte Methoden

Zellen mit einer 80%igen Konfluenz auf einer Wachstumsfläche von 450-525 cm² werden geerntet (siehe 4.8), gezählt (siehe 4.3) und für 5 min bei 700x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 2,0 ml 0,5% (v/v) PIC/Homogenisierungspuffer aufgenommen und die Zelllyse erfolgt im eisgekühlten Glas/Teflon Potter-Elvehjem-Homogenisator, indem 15 Hübe bei 800 rpm durchgeführt werden. Anschließend wird dem Zelllysate Saccharose mit einer Endkonzentration von 250 mM zugesetzt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 1.900x g und 4°C. Der Überstand wird in ein gekühltes konisches Röhrchen überführt. Das Pellet wird in 1,0 ml Homogenisierungspuffer, der 0,5% (v/v) PIC und 250 mM Saccharose enthält, resuspendiert und erneut für 10 min bei 1.900x g zentrifugiert. Der Überstand wird mit dem ersten vereinigt. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt. Der Gesamtüberstand aus den drei Zentrifugationen wird gut durchmischt und dann für 10 min bei 14.000x g und 4°C zentrifugiert. Abschließend wird das Pellet, das die mitochondriale Fraktion enthält, in 800 µl Homogenisierungspuffer (mit 0,5% (v/v) PIC und 250 mM Saccharose) resuspendiert, aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

4.16.2 Isolierung von Mitochondrien für in-Lösung Aktivitätstests

Mitochondrienfraktionen für in-Lösung Aktivitätstest (siehe 4.22.2) werden nach einem modifizierten Protokoll nach Janssen et al. [239] gewonnen. Dafür werden $3,0\text{--}4,0 \times 10^7$ Zellen geerntet (siehe 4.8 und 4.3). Das Zellpellet wird in Flüssigstickstoff schockgefrostet und sofort wieder aufgetaut (37°C) und anschließend in 1,0 ml TRIS-Homogenisierungspuffer aufgenommen. Die Zelllyse erfolgt im eisgekühlten Glas/Teflon Potter-Elvehjem-Homogenisator, indem 15 Hübe bei 800 rpm durchgeführt werden. Anschließend wird dem Zelllysats Saccharose mit einer Endkonzentration von 250 mM zugesetzt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei $700 \times g$ und 4°C . Der Überstand wird in ein gekühltes konisches Röhrchen überführt. Durch eine Zentrifugation für 10 min bei $14.000 \times g$ und 4°C werden die Mitochondrien sedimentiert, die anschließend in 500 μl TRIS-Homogenisierungspuffer aufgenommen werden. Zum Aufbrechen der Mitochondrienmembran werden die isolierten Mitochondrien in Flüssigstickstoff schockgefrostet und sofort wieder aufgetaut (37°C). Dieser Vorgang wird 2x wiederholt. Die Mitochondriensuspension wird dann bis zur weiteren Verwendung (siehe 4.22.2) auf Eis gelagert.

4.17 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt kolorimetrisch nach Bradford [240]. Das sogenannte Bradford-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 in kationischer (rot) und neutraler (grün) Form, wodurch das Absorptionsspektrum Extrema bei ungefähr 465 nm (kationische Form) und 650 nm (neutrale Form) aufweist. In Anwesenheit von Proteinen wird CBBG in saurer Lösung in die nicht frei vorliegende, anionische Form (blau, siehe Abb. 18 A) umgewandelt, wodurch im Absorptionsspektrum eine zusätzliche Schulter bei ca. 595 nm entsteht und die Intensität bei 470 nm abnimmt (siehe Abb. 18 B). Der Farbstoff komplexiert dabei vorwiegend mit Argininresten, aber auch mit anderen basischen (His, Lys) sowie aromatischen (Trp, Tyr, Phe) Resten [241]. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm gilt als Maß für die Proteinkonzentration und wird anhand eines Standardproteins (z.B. Rinderserumalbumin, BSA) mit bekannter Konzentration ermittelt.

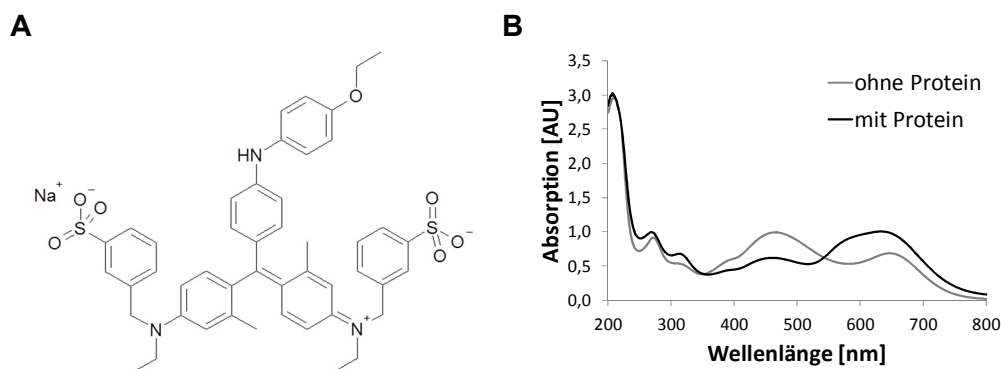


Abb. 18: Bradford Assay - (A) Struktur und (B) Absorptionsspektrum von Coomassie-Brilliantblau G250 (CBBG). CBBG (grau) weist Absorptionsextrema bei ~ 465 und ~ 650 nm auf. Durch die Bindung an Protein (schwarz) verringert sich die Intensität bei ~ 465 nm und ein weiteres Extremum bei ~ 595 nm entsteht. (Strukturformel erstellt nach [238])

DMEM-Vollmedium und jeweils 150 µl Detergens und Substratlösung gemischt (ATP Endkonzentration 0,5-15 µM). In drei Kavitäten einer weißen 96-well Platte werden jeweils 200 µl des ATP-Standards pipettiert und für 10 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Lumineszenz wird anschließend am infinite M1000 gemessen. Zur Ermittlung der ATP Konzentration der unbekannten Proben wird von allen gemessenen Werten der Leerwert subtrahiert. Anschließend werden die verschiedenen Konzentrationen des ATP-Standards gegen den Mittelwert der Lumineszenzintensitäten aufgetragen und anhand der Steigung die Konzentration der unbekannten Proben berechnet.

4.19 Fluoreszenzanisotropie

Alle Fluoreszenzanisotropiemessungen an isolierten Mitochondrien (siehe 4.16.1) wurden von Stefanie Kern im Rahmen ihrer Masterarbeit [245] selbstständig durchgeführt. Detaillierte Angaben zum Versuchsaufbau und der Methode sind deshalb ihrer Arbeit zu entnehmen.

Die Interkalation von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH, siehe Abb. 20) in den hydrophoben Bereich einer biologischen Membran ermöglicht die Messung der Fluoreszenzanisotropie, wodurch grundlegende Informationen über den physikalischen Zustand der Lipidphase erhalten werden [246]. Es wird angenommen, dass die Fluoreszenzanisotropie r proportional zur Viskosität der biologischen Membran ist [247], die wiederum invers proportional zur "Membranfluidität" ist [248]. Änderungen in der gemessenen Fluoreszenzanisotropie können deshalb vereinfacht als Änderungen der "Membranfluidität" angesehen werden.

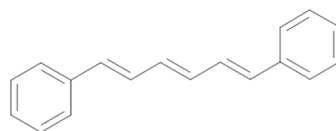


Abb. 20: Struktur von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH). (Abb. erstellt nach [249])

Zunächst werden 2,0 mM DPH/THF mit PBS verdünnt, um eine 10 µM DPH Arbeitslösung zu erhalten. Das THF wird durch Rühren für 20 min bei 42°C unter Lichtausschluss verdampft. Dann werden 12,5 µg isolierte Mitochondrienproteine (siehe 4.16.1) in PBS mit DPH Arbeitslösung (finale DPH-Konzentration 86 nM, Gesamtvolumen 1,25 ml) für 1 h bei 42°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Messungen werden in Quartzküvetten (Emission x Exzitation 4 x 10 mm) am Fluoreszenzspektrometer PTI M III in T-Konfiguration bei 37°C durchgeführt (Einstellungen in der Software FeliX siehe [245]). Angeregt wird mit vertikal polarisiertem (V) monochromatischem Licht, die Emissionsintensität wird horizontal (H) und vertikal (V) gemessen. Die Anisotropie r berechnet sich nach

$$r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}} \quad \text{mit } G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

I_{HH} : Polarisator horizontal, Analysator horizontal; I_{HV} : Polarisator horizontal, Analysator vertikal;

I_{VH} : Polarisator vertikal, Analysator horizontal; I_{VV} : Polarisator vertikal, Analysator vertikal

wobei G den G-Faktor des Gerätes darstellt, der vor jeder Messung bestimmt wird [245].

4.20 Solubilisierung von Membranproteinen

Als Solubilisierung bezeichnet man die Extraktion von Membranproteinen aus der Lipiddoppelschicht mit Hilfe von Detergenzien. Ein Detergens ist ein amphiphiles Molekül, welches oberhalb der kritischen Mizellären Konzentration (*critical micelle concentration*, CMC) Mizellen bildet. Während des Solubilisierungsvorgangs lagern sich die hydrophoben Reste des Detergens in die Lipiddoppelschicht bevorzugt in der Nähe der Transmembrandomäne eines Proteins ein und verdrängen dabei teilweise die Phospholipide [250]. Wenn die Lipiddoppelschicht mit Detergensmolekülen gesättigt ist (CMC erreicht), zerfällt sie und es bilden sich gemischte Mizellen bestehend aus Protein-Detergens, Lipid-Protein-Detergens und Lipid-Detergens [251] (siehe Abb. 21).

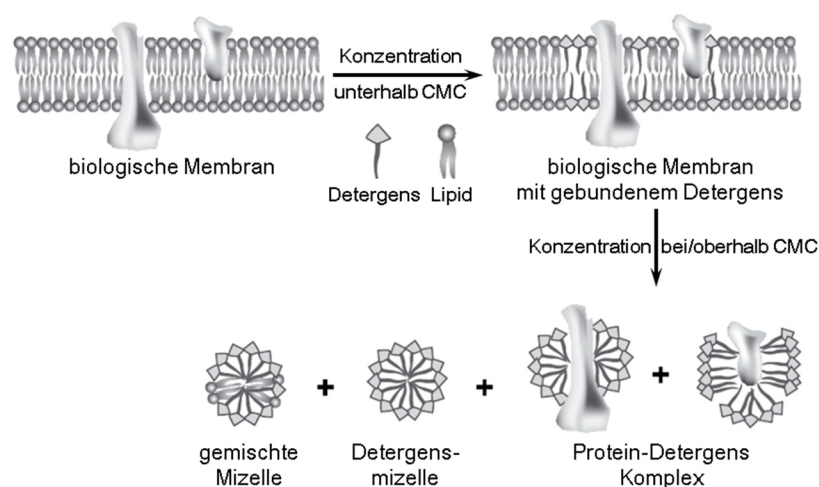


Abb. 21: Prinzip der Solubilisierung. Detergenzien in geringer Konzentration lagern sich als Monomere mit ihren hydrophoben Teilen in die Lipiddoppelschicht ein. Oberhalb der kritischen mizellären Konzentration (CMC) zerfällt die Membran. Es bilden sich gemischte Mizellen aus Lipid und Detergens, reine Detergensmizellen und Protein-Detergens-Komplexe, die zusätzlich noch Lipide enthalten können. (Abb. modifiziert nach Bhairi [251])

Um die native Konformation von Proteinen außerhalb der biologischen Membran zu erhalten, verwendet man milde nichtionische Detergenzien wie n-Dodecyl- β -D-maltosid, Triton X-100 oder Digitonin [252]. Sie werden als nicht denaturierende Detergenzien angesehen, weil sie hauptsächlich Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Interaktionen aufheben und Protein-Protein-Interaktionen kaum beeinträchtigen. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht (Lipidklassen, Proteine, Verhältnis von Protein/Lipid) variieren Solubilisierungsbedingungen für Membranproteine verschiedener biologischer Membranen [253]. Das Dergens/Protein-Verhältnis (D/P) ist deshalb ein wichtiger Faktor für eine effiziente Solubilisierung und muss für jede biologische Membran und jedes Detergens einzeln ermittelt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird das Steroid-Glykosid Digitonin als nicht-ionisches Detergens eingesetzt (siehe Abb. 22). Im Gegensatz zu n-Dodecyl- β -D-maltosid und Triton X-100 bewahrt es sogar schwache Protein-Protein-Interaktionen [253].

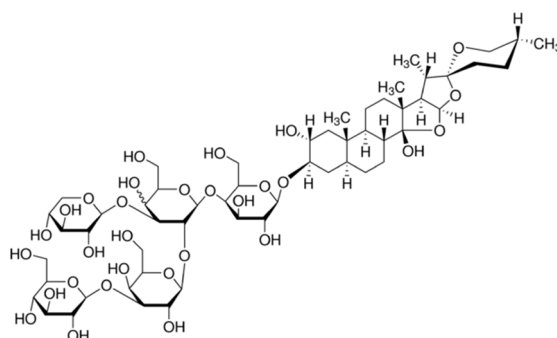


Abb. 22: Struktur des Steroid-Glykosids Digitonin. Digitonin wird aus dem Samen des Fingerhuts *Digitalis purpurea* gewonnen [254].

4.20.1 Solubilisierung von Membranproteinen aus Rinderherzmitochondrien (BHM)

Solubilisierete Membranproteine aus Rinderherzmitochondrien (BHM) dienen im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Standard für gelbasierte Methoden. Sie werden mittels Digitonin mit einem Detergens/Protein-Verhältnis von 3,0 g/g extrahiert (in der Arbeitsgruppe Dencher etablierter Wert). Dafür wird Digitonin mit dem 9-fachen Volumen an MilliQ-Wasser gemischt und so lange bei 95°C inkubiert, bis es sich gelöst hat (ca. 30 min), wodurch eine 10%ige Digitoninlösung entsteht.

Für die Solubilisierung werden 20 mg BHM mit 1,0 ml 2x Solubilisierungspuffer gemischt und für 8 min bei 20.800x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 1x Solubilisierungspuffer, der 0,5% (v/v) PIC enthält, aufgenommen und anschließend mit 600 µl einer 10%igen Digitoninlösung versetzt (ergibt ein Detergens/Protein-Verhältnis von 3g/g mit einer Gesamtdigitoninkonzentration von 1,0%). Die Probe wird für 30 min auf Eis inkubiert, währenddessen sie alle 10 min gut durchmischt wird. Zelltrümmer und andere nicht lösliche Bestandteile werden dann für 10 min bei 20.800x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand, der die solubilisierten Membranproteine enthält, wird aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.20.2 Solubilisierung von Membranproteinen aus Zellkulturen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die optimalen Solubilisierungsbedingungen für OLN-93 und SH-SY5Y Zellen etabliert. Es wird das geeignetste Detergens/Protein-Verhältnis, der maximale Gesamtdigitoninanteil in der Probe sowie die beste Probenmenge ermittelt. Dafür wird zunächst eine 10%ige Digitoninlösung hergestellt, indem Digitonin mit dem 9-fachen Volumen an MilliQ-Wasser gemischt und so lange bei 95°C inkubiert wird, bis es sich gelöst hat (ca. 30 min). Währenddessen wird die gewünschte Menge an isolierten Mitochondrien (siehe 4.16.1) mit 800 µl 1,11x Solubilisierungspuffer versetzt und für 8 min bei 20.800x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 1,11x Solubilisierungspuffer aufgenommen und mit Digitonin im gewünschten Detergens/Protein-Verhältnis unter Berücksichtigung des Gesamtdigitoninanteils in der Probe versetzt. Zelltrümmer und andere nicht lösliche Bestandteile werden dann für 10 min bei 20.800x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand, der die solubilisierten Membranproteine enthält, wird sofort auf ein BN-Gel aufgetragen (siehe 0).

Da nach der Solubilisierung keine erneute Proteinbestimmung erfolgt, beziehen sich alle in dieser Arbeit angegebenen Proteinmengen immer auf die Proteinmenge, die vor der Solubilisierung bestimmt wurde (siehe 4.17).

4.21 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamidgelelektrophoresen werden für die Separierung von Proteinen anhand ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel genutzt. Die Trennung erfolgt entlang eines elektrischen Feldes, wobei negativ geladene Moleküle in Richtung Anode und positiv geladene Moleküle in Richtung Kathode wandern. Kleine Moleküle wandern dabei schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels als große. Die Porengröße richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine und ist abhängig vom Verhältnis von Acrylamid zum Quervernetzer N,N'-Methylen-bisacrylamid im Gel [238].

4.21.1 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine denaturierende Elektrophorese. Das anionische Detergens SDS überdeckt dabei die Eigenladung der Proteine, so dass eine konstante negative Nettoladung pro Masseneinheit entsteht. Zudem denaturiert es Proteine. Hitze (95°C für 5-10 min) verstärkt diesen Effekt durch Aufspalten von Wasserstoffbrückenbindungen, wobei bei membranständigen Proteinen jedoch aufgrund der hydrophoben Bereiche der Transmembrandomäne die Möglichkeit der Aggregation besteht, wenn sie bei höheren Temperaturen inkubiert werden. Eine weitere Entfaltung der Proteine wird durch Spaltung von Disulfidbrücken mittels reduzierender Agenzien wie β -Mercaptoethanol und DTT erreicht [238]. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem Polyacrylamidgel entweder mit einem TRIS-Glycin-Puffersystem nach Laemmli [255] oder mit einem TRIS-Tricin-Puffersystem nach Schagger [256], wenn es sich um niedermolekulare Peptide (< 15 kDa) handelt. Die Elektrophorese wird in beiden Fällen mit dem der verwendeten Methode entsprechendem Laufpuffer bei 150 V und RT durchgeführt und ist beendet, wenn die Bromphenolblaulauf-front aus dem Gel herausgelaufen ist.

In der vorliegenden Arbeit werden denaturierte mitochondriale Proteine in einer SDS-PAGE nach Laemmli [255] aufgetrennt. Dafür werden 50-70 μ g isolierte Mitochondrien (siehe 4.16.1) auf Eis aufgetaut, in 21 μ l MilliQ-Wasser aufgenommen und mit 7,0 μ l 4x SDS-Probenaufragspuffer versetzt. Die Proben werden dann für 5 min bei 95°C gekocht oder für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 28 μ l Probe pro Spur auf ein mittelgroßes 12%iges Polyacrylamidgel (10 cm x 10 cm) mit 1,0 mm Dicke aufgetragen (siehe Tab. 7). Als Proteinmassenstandard werden auf das Gel PageRuler™ [257, 258] und MagicMark™ [259] (je 5,0 μ l/Spur) geladen. Die SDS-PAGE wird mit TRIS-Glycin-Laufpuffer durchgeführt und im Anschluss erfolgt ein Western Blot (siehe 4.23).

Tab. 7: Zusammensetzung 12%iger Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE nach Laemmli [255]. Die Volumina sind ausreichend für zwei mittelgroße Gele (10 cm x 10 cm) mit 1,0 mm Dicke. Für ein Gel werden 6,5 ml Trenngellösung benötigt. % T gibt den Gesamtacrylamidgehalt des Gels an und % C den Quervernetzungsgrad.

	Trenngel	Sammelgel
% T / % C	12/3,3	5/3,3
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	6,0 ml	1,25 ml
4x TRIS-Glycin-Trenngelpuffer	5,0 ml	-
8x TRIS-Glycin-Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
dest. VE-Wasser	8,74 ml	7,34 ml
20% (w/v) SDS	100 µl	50 µl
TEMED	15 µl	10 µl
10% (w/v) APS	150 µl	100 µl
Gesamtvolumen	20 ml	10 ml

Aβ-Monomere mit einer Molmasse von ~4,5 kDa und deren Aggregate werden in einer SDS-PAGE nach Schägger [256] aufgetrennt. Dafür werden 9,0 µg disaggregiertes Aβ-Peptid (siehe 4.7) mit 4x SDS-Probenauftragspuffer versetzt und auf ein mittelgroßes 18%iges Polyacrylamidgel (10 cm x 10 cm) mit 1,0 mm Dicke aufgetragen (siehe Tab. 8). Als Proteinmassenstandard wird Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder [260, 261] (5 µl/Spur) verwendet. Die SDS-PAGE wird mit TRIS-Tricin-Laufpuffer durchgeführt und im Anschluss erfolgt ein Western Blot (siehe 4.23).

Tab. 8: Zusammensetzung 18%iger Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE nach Schägger [256]. Die Volumina sind ausreichend für ein mittelgroßes Gel (10 cm x 10 cm) mit 1,0 mm Dicke. Für ein Gel werden 6,5 ml Trenngellösung benötigt. % T gibt den Gesamtacrylamidgehalt des Gels an und % C den Quervernetzungsgrad.

	Trenngel	Sammelgel
% T / % C	18/5	5/3,3
Rotiphorese® Gel 40 (19:1)	3,6 ml	-
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	-	0,5 ml
TRIS-Tricin-Gelpuffer	2,0 ml	1,0 ml
Ethylenglykol	2,4 ml	-
dest. VE-Wasser	-	2,5 ml
TEMED [ml]	12 µl	16 µl
10% (w/v) APS	32 µl	16 µl
Gesamtvolumen	8,0 ml	4,0 ml

4.21.2 Blau-native (BN) PAGE

In einer BN-PAGE werden Proteine unter nativen Bedingungen aufgetrennt, wodurch physiologische Interaktionen und Enzymaktivitäten erhalten bleiben (siehe Abb. 23) [253, 262]. Die BN-PAGE eignet sich besonders für die Auftrennung hydrophober Membranproteine, wie die Proteine der Atmungskette [252, 262, 263]. Als Ladungsträger dient Coomassie-Brilliantblau G250 (CBBG), das reversibel an Proteine bindet und ihnen so eine negative Nettoladung verleiht. Zudem verschiebt gebundenes CBBG den isoelektrischen Punkt sogar von extrem basischen Proteinen in saurere Bereiche, sodass sie bei pH 7,0-7,5 im elektrischen Feld zur Anode wandern [264]. CBBG zerstört kaum Protein-Protein-Interaktionen, jedoch werden fragile Assemblierungen trotzdem aufgelöst. Die elektrophoretische Auftrennung ist somit abhängig von der Größe und Form der nativen Proteine bzw. Proteinkomplexe [253].

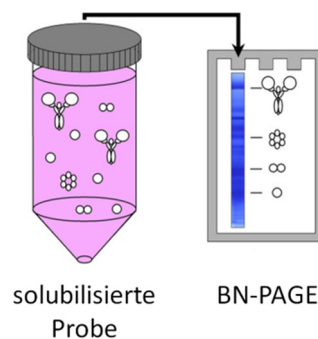


Abb. 23: Prinzip der blau-nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE). Solubilisierter Membranproteine werden auf ein natives Gradientengel geladen. Die Elektrophorese erfolgt unter nativen Bedingungen mittels Coomassie-Brilliantblau G250 als Ladungsträger und Detergensersatz, wodurch Proteinkomplexe intakt aufgetrennt werden und nicht in ihre Untereinheiten zerfallen. (Abb. modifiziert nach Eubel et al. [252])

Die für die BN-PAGE verwendeten Polyacrylamidgele müssen einen weiten Trennbereich aufweisen, damit sowohl kleine Proteine, die nur aus einer Untereinheit bestehen, aber auch große Proteinkomplexe, die sich aus verschiedenen Proteinen mit jeweils mehreren Untereinheiten zusammensetzen, gleichzeitig aufgetrennt werden können. Dies wird durch die Verwendung von Gradientengelen, deren Trenngele von oben nach unten linear zunehmende Acrylamidkonzentrationen aufweisen, erreicht. So können abhängig vom Gradienten Proteine und Proteinkomplexe zwischen 10 und 10.000 kDa detektiert werden [265].

In der vorliegenden Arbeit werden Gradientengele nach Krause und Seelert [253] gegossen. Um sicherzustellen, dass die Polymerisation vollständig abgelaufen ist, sollten BN-Gele frühestens einen Tag nach dem Gießen verwendet werden, weil es sonst zu Denaturierungen der aufzutrennenden Proben kommen könnte. BN-Gele können bis zu 5 Tage bei 4°C gelagert werden [253].

Es werden solubilisierter mitochondriale Proteine aus Zellkulturen (siehe 4.16.1 und 4.20.2) in einer BN-PAGE mit einem mittelgroßen 3-13%igem Gradientengel (siehe Tab. 9) in einem Imidazol-Puffersystem aufgetrennt. Dafür werden die entsprechenden Pufferreservoirs der Laufapparatur mit BN-Anodenpuffer bzw. B:10-Kathodenpuffer (enthält CBBG) befüllt und

die solubilisierten Proben aufgetragen. Zudem werden 30 µg Proteine aus Rinderherz-mitochondrien (BHM, siehe 4.20.1) als Standard und 2,0 µl HMW [266] als Protein-massenstandard in jeweils eine Tasche pipettiert. Leere Taschen werden mit 1,0% (w/v) Digitonin/Solubilisierungspuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgt bei 4°C, wobei mit 100 V und 15 mA pro Gel gestartet wird und die Spannung auf 250 V erhöht wird, sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hat. Ist die Lauffront aus dem Gel herausgelaufen, wird die Elektrophorese beendet.

Tab. 9: Zusammensetzung von Gradientengelen für die BN-PAGE. Die Volumina sind ausreichend für ein mittelgroßes Gel (10 cm x 10 cm x 1,5 mm) mit einem 3-13%igen Gradienten bzw. ein großes Gel (18 cm x 16 cm x 1,5 mm, gekennzeichnet in grau) mit einem 4-13%igen Gradienten. % T gibt den Gesamtacrylamidgehalt des Gels an und % C den Quervernetzungsgrad.

	Trenngel 1		Trenngel 2		Sammelgel	
% T / % C	13/3	13/3	3/3	4/3	3/3	3,5/3
Rotiphorese® Gel A	357 µl	6,23 ml	719 µl	1,92 ml	728 µl	1,7 ml
Rotiphorese® Gel B	-	2,89 ml	334 µl	889 µl	338 µl	786 µl
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	2,14 ml	-	-	-	-	-
3x BN-Gelpuffer oben	-	-	2,47 ml	4,94 ml	2,5 ml	5,0 ml
3x BN-Gelpuffer unten	2,47 ml	4,94 ml	-	-	-	-
dest. VE-Wasser	2,4 ml	715 µl	3,85 ml	7,0 ml	3,83 ml	7,38 ml
TEMED	2,05 µl	4,1 µl	3,4 µl	6,8 µl	10 µl	11,9 µl
10% (w/v) APS	20,5 µl	41 µl	34 µl	68 µl	100 µl	119 µl
Gesamtvolumen	~7,4 ml	~14,8 ml	~7,4 ml	~14,8 ml	~7,5 ml	~15,0 ml

Für die Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie und Peptidmassenfingeraabdruck (siehe 4.28) wird eine hohe Proteinkonzentration einzelner Spots im 2D-Gel (siehe 4.21.3) benötigt. Um größere Proteinmengen auftrennen zu können, werden große BN-Gele (18 cm x 16 cm x 1,5 mm) verwendet, weil sie ein größeres Taschenvolumen im Vergleich zu mittleren BN-Gelen aufweisen. Das 4-13%ige Trenngel des großen BN-Gels (siehe Tab. 9, grau unterlegt) wird dabei analog zum mittelgroßen Trenngel gegossen.

Die Pufferreservoirs werden mit BN-Anodenpuffer und B-Kathodenpuffer gefüllt. Anschließend werden pro Tasche 400 µg der Proben (siehe 4.20.2), 70 µg BHM und 5,0 µl HMW auf das Gel aufgetragen. Leere Taschen werden mit 1,0% (w/v) Digitonin/Solubilisierungsspuffer befüllt. Die Elektrophorese erfolgt bei 4°C, wobei mit 100 V und 15 mA pro Gel gestartet wird und die Spannung auf 500 V erhöht wird, sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hat. Nach ungefähr der Hälfte des Gellaufs wird der B-Kathodenpuffer durch B:10-Kathodenpuffer ausgetauscht um die Konzentration an CBBG zu reduzieren.

4.21.3 2D-BN/SDS-PAGE

Die 2D-BN/SDS-PAGE erlaubt es, Proteine mit mehreren Untereinheiten bzw. Proteinkomplexe aus verschiedenen Proteinen in ihre Untereinheiten aufzutrennen und so Informationen über Protein-Protein-Wechselwirkungen zu erhalten und Proteinuntereinheiten zu identifizieren [252, 267]. Dafür wird eine Spur eines BN-Gels ausgeschnitten (1. Dimension, siehe 0). Die Proteine innerhalb dieser Spur werden im Gel mit SDS und β -Mercapto-ethanol denaturiert und anschließend in einer SDS-PAGE nach Schägger [256] aufgetrennt (2. Dimension, siehe 4.21.1), indem der BN-Gelstreifen quer in das SDS-Gel eingebaut wird. Während der SDS-PAGE laufen die entsprechenden Untereinheiten entlang einer vertikalen Linie unterhalb des in der 1. Dimension nativ separierten Proteinkomplexes (siehe Abb. 24).

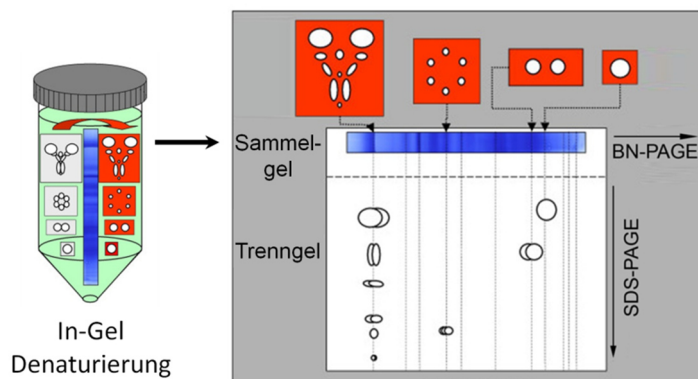


Abb. 24. Prinzip der 2D-BN/SDS-PAGE. Eine Spur aus einer BN-PAGE wird denaturiert (links) und quer in ein SDS-Polyacrylamidgel eingebaut (rechts). Die denaturierten Proteinkomplexe trennen sich während der SDS-PAGE in ihre Untereinheiten auf. (Abb. modifiziert nach Eubel et al. [252])

In der vorliegenden Arbeit wird das BN-Gel nach einer BN-PAGE in seine einzelnen Spuren unterteilt. Proteinkomplexe innerhalb einer Spur werden im Gel denaturiert, indem der BN-Gelstreifen 2x für je 30 min bei RT mit Denaturierungspuffer inkubiert wird. Anschließend wird der BN-Gelstreifen 3x für je 2 min mit MilliQ-Wasser gewaschen. Für den Einbau in die Gelgießapparatur wird der BN-Gelstreifen sowohl am unteren Ende als auch am oberen Ende ein wenig gekürzt und dann quer an den oberen Rand zwischen zwei Glasplatten gelegt, sodass auf einer Seite noch Platz zum Einfüllen der Gellösungen bleibt. Im Anschluss werden nacheinander das Trenngel und die beiden Sammelgele gegossen (siehe Tab. 10), wobei das Sammelgel 2, in das der BN-Gelstreifen eingebettet wird, in seiner Zusammensetzung dem BN-Gel ähnelt, um einen möglichst guten Übertritt der Proteine aus dem BN-Gelstreifen in das 2D-Gel zu ermöglichen. In das Sammelgel 2 wird ein Taschenkamm für den Proteinmassenstandard eingeführt. Nach dem Polymerisieren wird das Gel in die Laufkammer eingesetzt, die Pufferreservoirs mit 2D-Anoden bzw. 2D-Kathodenpuffer befüllt. In die eine Geltasche werden 2,0 μ l (mittelgroße Gele) bzw. 4,0 μ l (große Gele) LMW [268] gefüllt. Die SDS-PAGE wird anschließend bei 40-45 V und RT über Nacht (ca. 14 h) durchgeführt.

Tab. 10: Zusammensetzung 13%iger SDS-Gele für die SDS-PAGE in der 2. Dimension. Die Volumina sind ausreichend für zwei mittelgroße Gele (10 cm x 10 cm x 1,5 mm) oder ein großes Gel (18 cm x 16 cm x 1,5 mm). % T gibt den Gesamtacrylamidgehalt des Gels an und % C den Quervernetzungsgrad.

	Trenngel	Sammelgel 1	Sammelgel 2
% T / % C	13/3	5/3	5/3
Rotiphorese® Gel A	1,3 ml	810 µl	810 µl
Rotiphorese® Gel B	-	375 µl	375 µl
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	8,8 ml	-	-
3x 2D-Trenngelpuffer	10 ml	-	-
3x 2D-Sammelgelpuffer	-	1,65 ml	-
3x BN-Gelpuffer oben	-	-	1,65 ml
20% (w/v) SDS	-	-	50 µl
dest. VE-Wasser	9,75 ml	2,14 ml	2,07 ml
TEMED	15 µl	2,5 µl	3,5 µl
10% (w/v) APS	150 µl	25 µl	35 µl
Gesamtvolumen	30 ml	5,0 ml	5,0 ml

4.22 Aktivitätstests für OxPhos Komplexe

4.22.1 In-Gel Aktivitätstests

In-Gel Aktivitätstests dienen der Identifikation und Quantifizierung von enzymatisch aktiven Proteinkomplexen durch eine histochemische Färbung in nativen Gelen. Durch die Inkubation in einer Testlösung, die spezifisch für die Aktivität eines OxPhos Komplexes ist, bildet sich hierbei ein farbiges Präzipitat in Banden, welche die aktive Untereinheit enthalten.

In der vorliegenden Arbeit werden in-Gel Aktivitätstest für die OxPhos Komplexe I, IV und V durchgeführt. Beim in-Gel CI Aktivitätstest reduziert die NADH-Dehydrogenase Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zu Di-Formazan, welches im BN-Gel als violette Präzipitat in den Banden, die Komplex I enthalten, ausfällt (siehe Abb. 25) [269, 270]. Die Oxidation von Cytochrom c (Cyt c) durch die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (MTCO1) führt im in-Gel CIV Aktivitätstest dazu, dass 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) gleichzeitig oxidiert und polymerisiert wird, wodurch ein braunes Präzipitat in CIV enthaltenen Banden ausfällt (siehe Abb. 26). Der genaue Reaktionsmechanismus ist jedoch nicht bekannt [270]. Die Hydrolyse von ATP (die Umkehrreaktion der ATP Synthese) durch Komplex V wird in einem in-Gel Hydrolyseaktivitätstest durch die Zugabe von Blei(II)nitrat visualisiert. Blei(II)-nitrat reagiert mit dem durch die ATP Hydrolyse entstandenen Phosphat (P_i) zu Bleiphosphat, das ein weißes, schwer lösliches Präzipitat auf allen CV enthaltenen Banden generiert (siehe Abb. 28) [270].

In-Gel Aktivitätstest können qualitativ oder quantitativ durchgeführt werden. Bei einer qualitativen Analyse (CV) wird das BN-Gel so lange in der Testlösung inkubiert, bis die histochemische Färbung die gewünschte Intensität erreicht hat, wodurch Banden identifiziert

werden können, die den entsprechenden OxPhos Komplex enthalten. Die quantitative Analyse (CI und CIV) erfolgt densitometrisch und ermöglicht die Verfolgung der Präzipitatzunahme mit der Zeit zur Ermittlung der Enzymaktivität.

4.22.1.1 Quantitativer in-Gel Aktivitätstest für OxPhos Komplex I bzw. IV

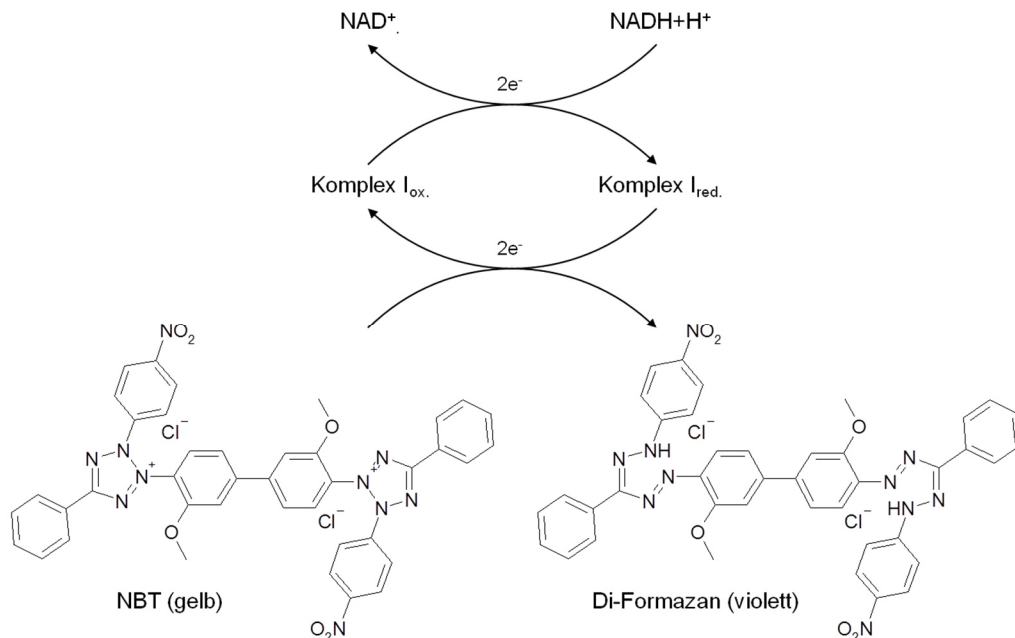


Abb. 25: Mechanismus der Präzipitatbildung beim in-Gel Aktivitätstest für Komplex I [269].

Komplex I katalysiert die Oxidation von NADH+H⁺ zu NAD⁺. Die Regeneration des Enzyms führt zur Reduktion von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT). Es entsteht Di-Formazan, das als violettes Präzipitat in allen Komplex I enthaltenen Banden ausfällt. (Abb. erstellt nach [271, 272])

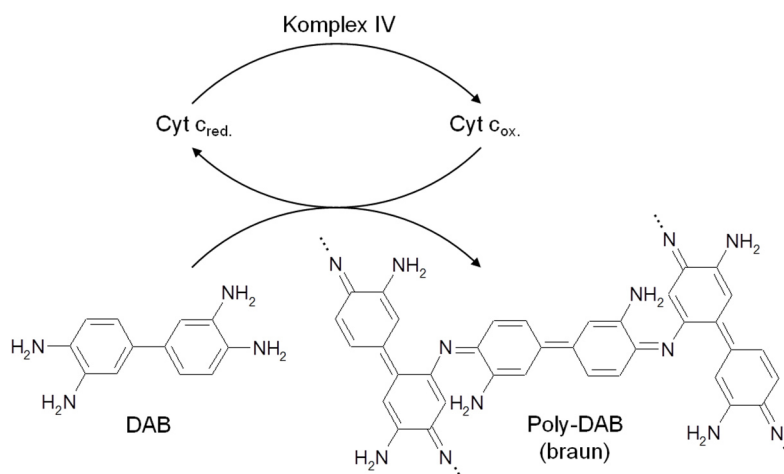


Abb. 26: Mechanismus der Präzipitatbildung beim in-Gel Aktivitätstest für Komplex IV [270].

Komplex IV oxidiert Cytochrom c (Cyt c), welches wiederum 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) reduziert. Es entsteht ein braunes Präzipitat aus oxidiertem und polymerisiertem DAB (Poly-DAB) in allen CIV enthaltenen Proteinbanden. (Abb. erstellt nach [272, 273])

Für quantitative in-Gel Aktivitätstests werden solubilisierete Membranproteine aus isolierten Mitochondrien (siehe 4.16.1 und 4.20.2) in einer BN-PAGE (siehe 0) aufgetrennt. Im Anschluss an die Elektrophorese wird das BN-Gel für 10 min mit MilliQ-Wasser gewaschen und dann in die entsprechende Aktivitätstestlösung gelegt. Um die Präzipitatbildung zu verfolgen, werden die BN-Gele im Zeitintervall von 5 min densitometrisch vermessen (Gelscanner ViewPix 900, Auflösung 600 dpi, 16 bit Graustufen, TIFF-Dateiformat). Nach 180 min wird der Aktivitätstest durch schwenken des BN-Gels in Aktivitätsteststopplösung beendet.

Die quantitative Auswertung erfolgt mit der Software Delta2D [274, 275]. Dafür werden alle aufgenommenen Graustufenbilder eines Aktivitätstest in ein neues Projekt innerhalb der Software importiert und anhand der aufsteigenden Inkubationszeit in der Aktivitätstestlösung sortiert. Während des sogenannten *Warings* werden identische Proteinbanden auf unterschiedlichen Gelbildern durch mathematische Vektoren (*match vectors*) verknüpft, wodurch virtuell alle Gelbilder identisch übereinander gelegt werden. Das *Waring* folgt dabei der *Chained Waring Strategy*. Das bedeutet, dass das zweite Gelbild (t=5 min) auf das erste (t=0 min) *gewarpt* wird, das dritte (t=10 min) auf das zweite (t=5 min) und so weiter. Die Software generiert anschließend ein Überlagerungsbild aus allen Gelbildern, das sogenannte Fusionsgel. Auf diesem Fusionsgel werden die zu quantifizierenden Proteinbanden markiert und nummeriert. Um die Bandengrenzen genau festlegen zu können, wird jede Bande mit dem 3D *Tool* einzeln aufgerufen und begutachtet. Anschließend werden alle markierten Banden auf dem Fusionsgel auf die einzelnen Gelbilder transferiert. Die Software quantifiziert nun die Grauwerte aller Pixel innerhalb einer jeden Bandenmarkierung als absolutes Grauwertpixelvolumen V einer jeden Bande. V ist dabei proportional zur Proteinaktivität der Bande.

Die weitere Auswertung erfolgt mit MS Excel nach folgender Formel:

$$\text{Präzipitatzunahme} = \frac{V_{t(0)} - V_{t(x)}}{V_{t(0)} \cdot F_M \cdot F_N}$$

$$\text{mit } F_M = \frac{M_{\text{Komplex}(x)}}{M_{\text{Superkomplex}}} \text{ und } F_N = \text{Anzahl Komplex}(x) \text{ im Superkomplex}$$

V: Grauwertpixelvolumen zum Zeitpunkt t; F_M : Molmassenfaktor; M: Molmasse; F_N : Normierungsfaktor

Um die Präzipitatzunahme einer Bande zu kalkulieren, wird zunächst das Hintergrundsignal (V bei t_0) von allen erhaltenen Werten (V bei t_x) subtrahiert. Desweiteren werden die Werte durch die Proteinmenge geteilt. Diese erhält man als relativen Wert aus V bei t_0 , weil die Proteinbanden durch die BN-PAGE bereits mit CBBG gefärbt sind und so als relatives Maß der Proteinmenge angesehen werden können. Desweiteren muss berücksichtigt werden, dass in Superkomplexen nur ein Komplex für die Präzipitatbildung (Aktivität) verantwortlich ist. Aus diesem Grund wird der Molmassenfaktor F_M in die Formel eingefügt. Dieser bildet den Quotienten aus der Molmasse des Komplexes mit der aktiven Untereinheit (Kopienanzahl beachten) und der Molmasse des Superkomplexes (siehe Tab. 11). Da sich Superkomplexe häufig nicht nur aus einer Kopienzahl eines individuellen Komplexes zusammensetzen, wird ebenfalls der Normierungsfaktor F_N berücksichtigt, wodurch die Präzipitatzunahme auf die Kopienzahl 1 normiert wird und somit Superkomplexe und individueller Komplex miteinander

der verglichen werden können. Die erhaltenen Werte für die Präzipitatzunahme einer jeden Bande werden gegen die Zeit in min aufgetragen. Innerhalb des linearen Bereiches wird eine Regressionsgerade erstellt, deren Steigung die relative spezifische Aktivität in Graueinheiten pro Minute darstellt.

Der individuelle Komplex V (V₁) dient als Negativkontrolle. Durch die Inkubation in Aktivitätstestlösung bildet sich kein Präzipitat. Die Steigung und somit auch die spezifische Aktivität sind demnach null. Zudem kann anhand dieser Kontrolle sichergestellt werden, dass die Hintergrundfärbung konstant bleibt (keine Auswaschungseffekte der Coomassiefärbung). Abb. 27 zeigt den quantitativen in-Gel Aktivitätstest für den OxPhos Komplex I (A-C) bzw. IV (D-E) am Beispiel von BHM.

Tab. 11: Molmassen der OxPhos Komplexe [276].

Komplex	Molmasse
I ₁	1000 kDa
II ₁	130 kDa
III ₂	500 kDa
IV ₁	200 kDa
V ₁	750 kDa

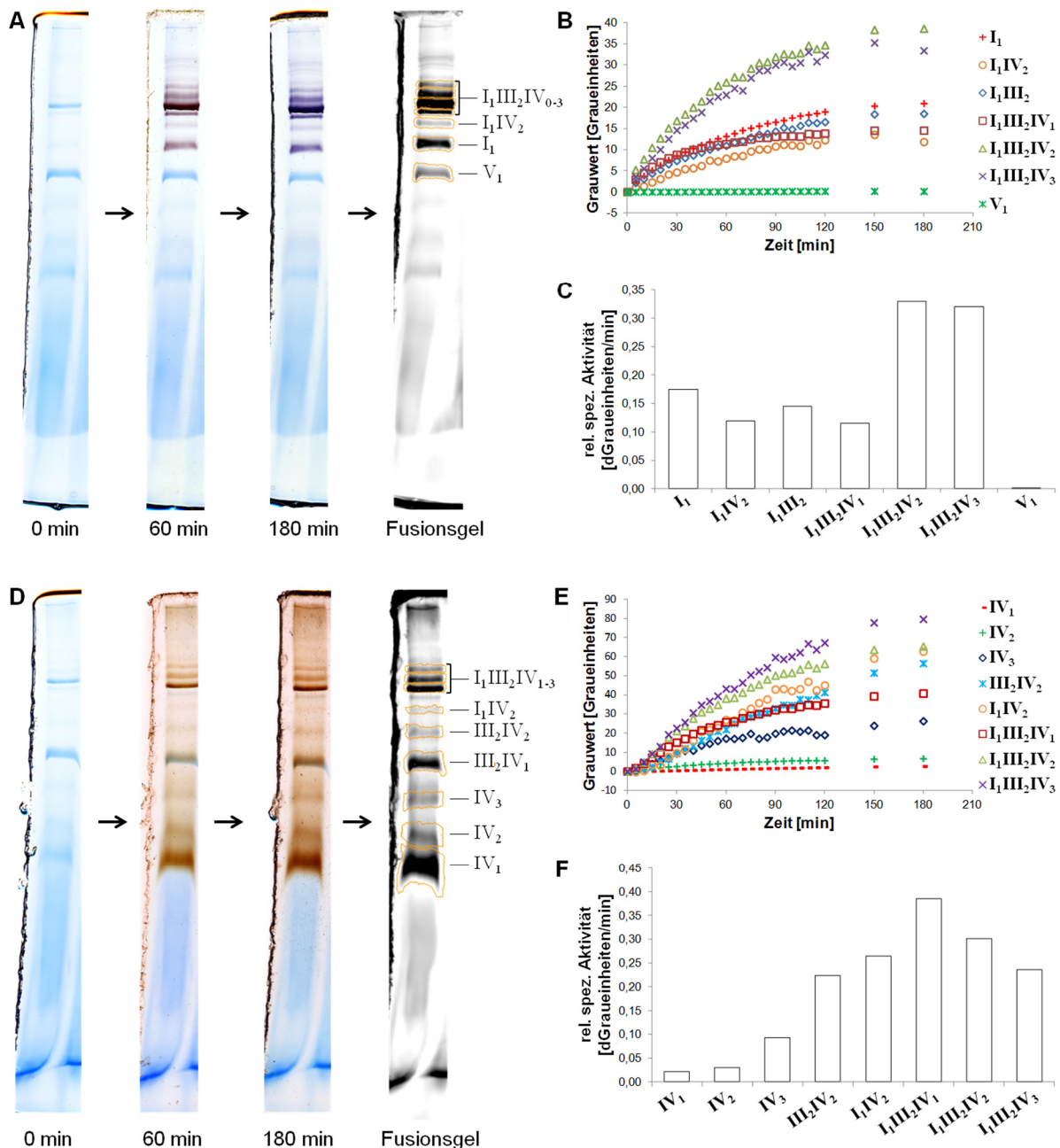


Abb. 27: Quantitativer in-Gel Aktivitätstest für den OxPhos Komplex I (A-C) bzw. IV (D-F) am Beispiel BHM. Solubilisierte Membranproteine aus BHM werden in einer BN-PAGE aufgetrennt und anschließend in Aktivitätstestlösung inkubiert. Mit zunehmender Zeit bildet sich ein Präzipitat in den Banden, die das Protein mit der aktiven Untereinheit enthalten. Mit der Software Delta2D wird dann ein Fusionsgel erstellt, das die Präzipitatbildung zu verschiedenen Zeitpunkten beinhaltet (A+D). Nach der Quantifizierung einer jeden Bande wird der Wert der Präzipitatzunahme gegen die Zeit aufgetragen (B+E). Die Steigung innerhalb des linearen Bereichs entspricht der relativen spezifischen Enzymaktivität (C+F).

4.22.1.2 Qualitativer in-Gel Hydrolyseaktivitätstest für OxPhos Komplex V

Für den in-Gel Hydrolyseaktivitätstest für Komplex V werden zunächst die isolierten und solubilisierten Mitochondrienproteine (siehe 4.16.1 und 4.20.2) in einer BN-PAGE (siehe 4.21.2) aufgetrennt. Im Anschluss wird das BN-Gel für 10 min mit MilliQ-Wasser ge-

waschen. Der in-Gel Hydrolyseaktivitätstest findet über Nacht bei RT unter leichtem Schütteln in CV Hydrolyseaktivitätstestlösung (nach Marx [277]) statt. Am nächsten Tag wird das BN-Gel für ca. 45 min in CV Hydrolyseaktivitätsteststopplösung inkubiert und anschließend für ca. 30 min mit MilliQ-Wasser gewaschen. Die Detektion des Präzipitats erfolgt mit einer CCD-Kamera (*Imaging System LAS-3000*) bei weißem Licht und ohne Filter. Das Bild wird im TIFF-Dateiformat gespeichert.

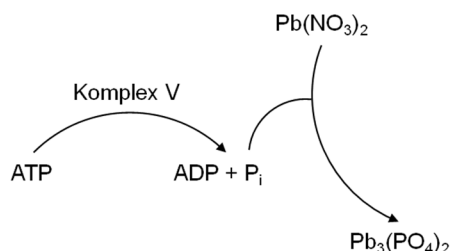


Abb. 28: Mechanismus der Präzipitatbildung beim in-Gel Hydrolyseaktivitätstest für Komplex V [270]. Komplex V hydrolysiert ATP in ADP und Phosphat (P_i). Das Phosphat reagiert mit Blei(II)nitrat zu Bleiphosphat (Pb₃(PO₄)₂), wodurch sich ein weißes Präzipitat auf allen Komplex V enthaltenen Banden bildet. (Abb. erstellt nach [270, 272])

4.22.2 In-Lösung Aktivitätstests

In-Lösung Aktivitätstests für die OxPhos Komplexe I, II und IV sowie für die Normierungskontrolle Citrat-Synthase (CS) werden nach einem modifizierten Protokoll von Spinazzi et al. [237] durchgeführt. Alle Messungen am UV-VIS-Scanning Spektrophotometer UV-2102 PC finden in Quartzküvetten (Typ 109.004-QS) mit einer Schichtdicke von 10 mm unter kontinuierlichem Rühren statt. Die Messparameter sind Tab. 12 zu entnehmen.

Tab. 12: Messparameter für die spektrophotometrische Messung der in-Lösung Aktivität der OxPhos Komplexe I, II und IV sowie der Citrat-Synthase [237].

	Komplex I	Komplex II	Komplex IV	Citrat-Synthase
Wellenlänge	340 nm	600 nm	550 nm	412 nm
Temperatur	37°C	37°C	37°C	37°C
Messintervall	0,1 s	0,1 s	0,1 s	0,1 s
Messdauer	250 s	400 s	400 s	250 s

Für die Messungen werden entweder Zelllysate (CII, CIV und CS, siehe 4.15) oder isolierte Mitochondrien (CI, CS, siehe 4.16.2) verwendet. Zunächst wird eine Basislinie aufgenommen. Wenn diese einen konstanten, horizontalen Verlauf aufweist (keine messbare Aktivität), wird die Reaktion durch Zugabe eines Substrates gestartet. Zum Nachweis der Spezifität kann die Reaktion entweder in derselben Messung durch einen Inhibitor abgestoppt werden (CII und CIV) oder in einer separaten Messung mit Inhibitorzugabe (CI). Die für die OxPhos Komplexe spezifischen Inhibitoren sind Tab. 13 zu entnehmen.

Tab. 13: Inhibitoren der OxPhos Komplexe I, II und IV [237].

	Komplex I	Komplex II	Komplex IV
Inhibitor	Rotenon	Malonat	Kaliumcyanid
Inhibition	> 65%	> 98%	> 95%

Der CI in-Lösung Aktivitätstest visualisiert photometrisch den enzymatischen Umsatz von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ , wodurch es zu einer Abnahme der Absorption bei 340 nm kommt. CII oxidiert Succinat zu Fumarat, was zur gleichzeitigen Reduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol-natrium (DCPIP) führt (siehe Abb. 29). Da sich durch die Reduktion der blaue Farbstoff entfärbt, nimmt die Absorption bei 600 nm ab [278]. Der CIV in-Lösung Aktivitätstest basiert auf der enzymatischen Oxidation von Cytochrom c (Cyt c) und der dadurch bedingten Absorptionsabnahme bei 550 nm. Durch die Citrat-Synthase werden Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat und Coenzym A (CoA) umgesetzt. CoA reagiert mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) unter Freisetzung von 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB^-), welches zum gelben Farbstoff TNB^{2-} deprotoniert, der bei 412 nm absorbiert (siehe Abb. 31) [279]. Die Enzymaktivität ergibt sich schließlich aus der Steigung (Δ Absorption/min) des linearen Bereichs der Aktivitätsmessung nach folgender Formel [237]:

$$\text{Enzymaktivität} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right] = \frac{\Delta \text{ Absorption/min} \cdot 1000}{(\text{Extinktionskoeffizient} \cdot \text{Probenvol. [ml]}) \cdot \text{Proteinkonz.} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]}$$

Die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Substrate sind in Tab. 14 aufgeführt.

Tab. 14: Extinktionskoeffizienten der umgesetzten Substrate für die Berechnung der in-Lösung Aktivität der OxPhos Komplexe I, II und IV sowie der Citrat-Synthase [237].

	Komplex I	Komplex II	Komplex IV	Citrat-Synthase
Substrat	NADH	DCPIP	Cyt c _{red.}	DTNB
Extinktionskoeffizient [mmol⁻¹cm⁻¹]	6,2 (bei λ_{340})	19,1 (bei λ_{600})	18,5 (bei λ_{550})	13,6 (bei λ_{412})

Es ist zu beachten, dass für die Berechnung der spezifischen Komplex I Aktivität die Rotenon-resistente Aktivität (Inhibitormessung) von der CI Aktivität subtrahiert werden muss, um ausschließlich die Komplex I katalysierte Oxidation von NADH zu erhalten (NADH wird auch an anderen Stellen des Stoffwechsels oxidiert). Alle Werte werden auf die mittlere Citrat-Synthase Aktivität normiert.

4.22.2.1 Quantitativer in-Lösung Aktivitätstest für OxPhos Komplex I

Für einen spezifischen CI in-Lösung Aktivitätstest müssen isolierte Mitochondrien verwendet werden. Dafür wird die gewünschte Menge an isolierten Mitochondrien (siehe 4.16.2) mit MilliQ-Wasser auf ein Volumen von 193,6 μl aufgefüllt (ausreichend für ein Duplikat). Die Messung (siehe Tab. 12) wird mit 912 μl CI Reaktionspuffer (siehe Tab. 15) gestartet. Nach 100 s werden 88 μl Mitochondriensuspension hinzugefügt und die Reaktion für 150 s verfolgt. Für die Inhibitionskontrollmessung wird dem CI Reaktionspuffer Rotenon mit einer

finalen Konzentration von 20 μM zugesetzt. Als Referenz wird Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) verwendet.

Tab. 15: Reaktionspuffer für Komplex I in-Lösung Aktivitätstests [237]. Der Reaktionspuffer wird am Verwendungstag mit MilliQ-Wasser angesetzt.

Reaktionspuffer für die CI in-Lösung Aktivität	
50 mM	Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5)
3,0 mg/ml	BSA (fettsäurefrei)
300 μM	KCN
120 μM	Decylubichinon
100 μM	NADH

4.22.2.2 Quantitativer in-Lösung Aktivitätstest für OxPhos Komplex II

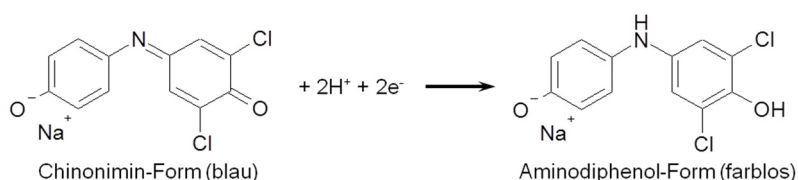


Abb. 29: Mechanismus des in-Lösung Aktivitätstest für den OxPhos Komplex II. Durch die Komplex II katalysierte Umsetzung von Succinat zu Fumarat werden zwei Elektronen auf 2,6-Dichlorphenol-indophenol-natrium (DCPIP, blau) übertragen, wodurch es reduziert wird. Die reduzierte Form ist farblos, weshalb es zu einer Absorptionsabnahme bei 600 nm kommt. (Abb. erstellt nach [278])

Der CII in-Lösung Aktivitätstest wird in Duplikaten durchgeführt. Dafür wird die gewünschte Menge an Zelllysats (siehe 4.15) mit MilliQ-Wasser auf ein Volumen von 224 μl verdünnt. Für eine vollständige Aktivierung des Enzyms werden 105 μl Zellsuspension mit 922 μl CII Reaktionspuffer (siehe Tab. 16) für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 996 μl der Mischung in eine Quartzküvette überführt und die Messung gestartet (siehe Tab. 12). Nach 100 s werden 50 μM Decylubichinon (im Gegensatz zu Ubichinon ist es wasserlöslich) hinzugefügt und nach weiteren 150 s wird die Reaktion durch Zugabe von 10 mM Malonat abgestoppt. Als Referenz dient Kaliumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,5).

Tab. 16: Reaktionspuffer für Komplex II in-Lösung Aktivitätstests [237]. Der Reaktionspuffer wird am Verwendungstag mit MilliQ-Wasser angesetzt.

Reaktionspuffer für die CII in-Lösung Aktivität	
25 mM	Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5)
1,0 mg/ml	BSA (fettsäurefrei)
300 μM	KCN
20 mM	Succinat
80 μM	DCPIP

4.22.2.3 Quantitativer in-Lösung Aktivitätstest für OxPhos Komplex IV

Zunächst wird Cytochrom c reduziert, indem es in Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,0) gelöst wird und dann einige Körner Natriumdithionit zugegeben werden, bis sich die bräunliche Lösung orange-pink färbt (siehe Abb. 30). Danach wird die gewünschte Menge an Zelllysats (siehe 4.15) mit MilliQ-Wasser auf ein Volumen von 440 µl verdünnt (ausreichend für ein Duplikat). Es wird eine Basislinie mit 800 µl CIV Reaktionspuffer (siehe Tab. 17) für 100 s aufgenommen (siehe Tab. 12), bevor die Reaktion durch die Zugabe von 200 µl Zellsuspension gestartet wird. Nach weiteren 150 s wird die Reaktion durch 300 µM KCN inhibiert. Als Referenz wird Kaliumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,0) verwendet.

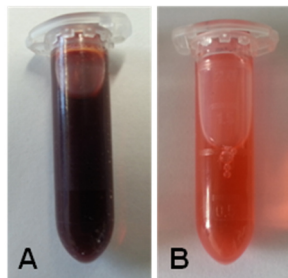


Abb. 30: (A) Oxidiertes und (B) reduziertes Cytochrom c (Cyt c) gelöst in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0). Durch die Zugabe von Natriumdithionit wird Cyt c reduziert. Die bräunliche Lösung wird dadurch orange-pink.

Tab. 17: Reaktionspuffer für Komplex IV in-Lösung Aktivitätstests [237]. Der Reaktionspuffer wird am Verwendungstag mit MilliQ-Wasser angesetzt.

Reaktionspuffer für die CIV in-Lösung Aktivität	
25 mM	Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0)
50 µM	Cyt c _{red.}

4.22.2.4 Quantitativer in-Lösung Aktivitätstest für Citrat-Synthase

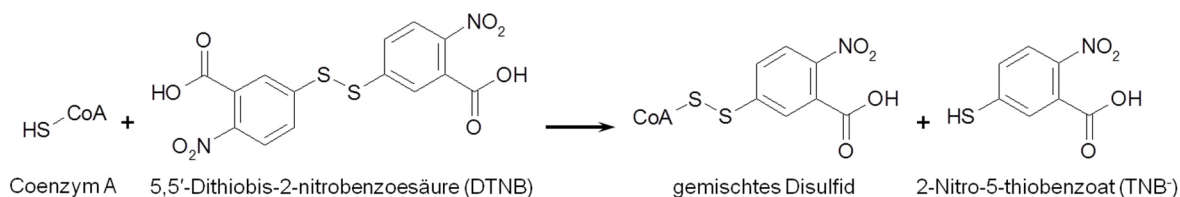


Abb. 31: Mechanismus des in-Lösung Aktivitätstests für die Citrat-Synthase. Die Citrat-Synthase katalysiert die Umsetzung von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat und Coenzym A. Diese Enzymaktivität wird durch die Reaktion des Coenzym A mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) visualisiert. Es entsteht 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB'), das zum gelben Farbstoff TNB²⁻ deprotoniert. TNB²⁻ absorbiert bei einer Wellenlänge von 412 nm. (Abb. erstellt nach [279])

Der in-Lösung Aktivitätstest für die Citrat-Synthase wird entweder mit Zelllysaten (siehe 4.15) oder mit isolierten Mitochondrien (siehe 4.16.2) durchgeführt. In beiden Fällen wird die Suspension mit MilliQ-Wasser auf ein Volumen von 242 µl aufgefüllt (ausreichend für ein

Duplikat). Anschließend werden 110 µl Suspension mit 840 µl CS Reaktionspuffer (siehe Tab. 18) in einer Quartzküvette gemischt, die Basisline für 100 s aufgenommen (siehe Tab. 12) und dann die Reaktion durch die Zugabe von 500 µM Oxalessigsäure gestartet. Die Reaktion wird über 150 s verfolgt. Als Referenz dienen 0,1% (v/v) Triton X-100 in 100 mM TRIS (pH 8,0).

Tab. 18: Reaktionspuffer für Citrat-Synthase in-Lösung Aktivitätstests [237]. Der Reaktionspuffer wird am Verwendungstag mit MilliQ-Wasser angesetzt.

Reaktionspuffer für die CS in-Lösung Aktivität	
100 mM	TRIS (pH 8,0)
0,1% (v/v)	Triton X-100
100 µM	DTNB
300 µM	Acetyl-CoA

4.22.3 Aktivitätstest mit immobilisiertem OxPhos Komplex I

Für den Aktivitätstest mit einem immobilisierten Komplex I wird das Complex I Enzyme Activity Microplate Assay Kit nach Angaben des Herstellers [280] verwendet. Komplex I wird dabei über einen sogenannten Fängerantikörper (*capture antibody*, spezifisch für CI aus humanen, Ratten- und Mausproben) in einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Wie bereits in Kapitel 4.22.1 beschrieben, wird durch Komplex I Aktivität ein Tetrazoliumsalz zu Di-Formazan umgesetzt. Die Bildung des violetten Di-Formazans wird bei einer Absorption von 450 nm über die Zeit verfolgt.

Die gewünschte Menge isolierter Mitochondrien (siehe 4.16.1) wird in 130 µl PBS aufgenommen und mit 1/10 Volumen Detergens versetzt (finale Konzentration von n-Dodecyl-β-D-Maltosid + Laurylmaltosid: 1,0%). Die Mischung wird für 30 min auf Eis inkubiert, währenddessen alle 10 min gut durchmischt wird. Anschließend wird für 20 min bei 12.000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in einem frischen Reaktionsgefäß 1:5 mit Inkubationslösung versetzt und je 200 µl der Mischung werden in drei Kavitäten der dem Kit beigelegten Mikrotiterplatte gefüllt (Triplikatmessung). Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei RT werden die Kavitäten 2x mit je 200 µl CI Puffer gewaschen. Dann werden in jede Kavität 200 µl CI Reaktionslösung (siehe Tab. 19) gegeben und die Messung unmittelbar nach der Zugabe gestartet (Absorption bei 450 nm, Dauer 30 min, Intervall 30 s, RT, Schütteln vor den Messungen). Die Komplex I Aktivität errechnet sich nach Subtraktion des Leerwertes (*blank*, enthält alle Komponenten außer Zellen) aus der Steigung (ΔAbs./min).

Tab. 19: Complex I Enzyme Activity Microplate Assay Kit - Zusammensetzung der Assay Lösung [280]. Die Volumina sind ausreichend für 8 Kavitäten.

CI Reaktionslösung	
1,67 ml	CI Puffer
84 µl	NADH
17 µl	Farbstoff

4.23 Western Blot

Die immunochemische Identifikation von Proteinen, die elektrophoretisch aufgetrennt wurden (siehe 4.21), erfolgt im Western Blot [250]. Dafür werden Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Transfermembran aus Nitrozellulose [281] oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) [282] mittels eines elektrischen Feldes transferiert und auf dieser über Antikörper spezifisch nachgewiesen. Dieser Nachweis erfolgt dabei durch das an die Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) in einer Chemilumineszenzreaktion (*Enhanced Chemiluminescence Reaction*, ECL-Reaktion, siehe Abb. 32). HRP oxidiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid unter basischen Bedingungen Luminol, wobei ein Photon im blauen Bereich des Lichtspektrums ($\sim 428\text{ nm}$) emittiert wird, welches durch Schwärzung eines Röntgenfilms oder mittels CCD-Kamera detektiert wird [238, 250].

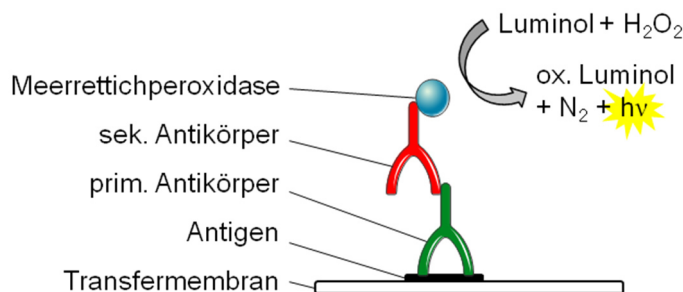


Abb. 32: Western Blot - Immunochemische Detektion eines Proteins auf einer Transfermembran. Das Antigen auf der Transfermembran wird spezifisch vom Paratop des Primärantikörpers gebunden und an den Fc-Teil des Primärantikörpers binden Sekundärantikörper, die mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt sind. HRP oxidiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) unter basischen Bedingungen Luminol, wobei Licht emittiert wird, das dann detektiert wird. (Abb. erstellt nach Luttmann et al. [233])

Der Transfer der Proteine auf die Membran wird in der vorliegenden Arbeit nach dem *Semidry* Verfahren [283] durchgeführt (siehe Abb. 33). Dafür werden Whatmanpapiere sowie Nitrozellulosemembran kurz in Towbin Puffer [281] getränkt. Eine PVDF-Membran muss vor der Verwendung für 5 min in Methanol aktiviert werden [250]. Anschließend wird ein Stapel aus Whatmanpapier, Nitrozellulose- oder PVDF-Membran, Polyacrylamidgel und Whatmanpapier luftblasenfrei zwischen die Elektroden der Blot-Apparatur platziert. Während des Blot-Vorganges bei konstanter Spannung wandern die Proteine aus dem Gel auf die Transfermembran, wo sie durch hydrophobe Wechselwirkungen haften bleiben. Die Blot-Bedingungen (Dauer und angelegte Spannung) sind abhängig von der Dicke und Größe des verwendeten Polyacrylamidgels sowie des Molmasse der Proteine, die transferiert werden sollen. Nach Beendigung des Transfers können die Proteine zur Überprüfung der Blot-Effizienz mit Ponceau S auf der Transfermembran sichtbar gemacht werden (siehe 4.26.4).

Für die immunochemische Detektion eines spezifischen Proteins werden zunächst freie Bindestellen auf der Membran gesättigt (sogenanntes Blocken). Dafür wird die Membran 30-60 min in Blockpuffer bei RT geschwenkt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem antigenspezifischen Primärantikörper (siehe Tab. 20) für mind. 2 h bei RT oder über Nacht (ÜN) bei 4°C ebenfalls schwenkend. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wird

die Membran 3x für je 5 min mit 1x PBS-T gewaschen und dann für 1-2 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (siehe Tab. 21) schwenkend inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen der Membran für je 5 min mit 1x PBS-T erfolgt die ECL-Detektion nach Haan und Beermann [284]. Dafür wird die Membran mit frischer 4-IPBA-ECL Lösung vollständig benetzt und im 10 s Intervall werden Bilder mit einer CCD-Kamera (*Imaging System LAS-3000*, weiße Lichtquelle) aufgenommen, bis das Signal gesättigt ist. Das Bild mit dem gesättigten Signal wird im TIFF-Dateiformat gespeichert. Zur besseren Auflösung der einzelnen Banden/Spots werden mit der Software ImageJ sogenannte Plotprofile erstellt. Plotprofile visualisieren Pixelintensitäten entlang einer Linie, die durch die Banden/Spots gelegt wird in einem Diagramm (Pixelintensität gegen Wegstrecke der Linie).

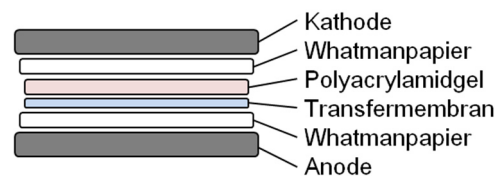


Abb. 33: Western Blot - Blot-Zusammenbau nach dem Semidry Verfahren. Whatmanpapiere und Nitrozellulosemembran werden in Towbin Puffer getränkt, PVDF-Membran wird in Methanol aktiviert. Ein Stapel aus Whatmanpapier, Transfermembran, Polyacrylamidgel und Whatmanpapier wird zwischen die Elektroden der Blot-Apparatur platziert. Der Stromfluss erfolgt senkrecht von der Kathode zur Anode. (Abb. erstellt nach Lottspeich [238])

Damit auch auf einem Blot die Molmasse einer Bande abgeschätzt werden kann, werden SDS-Polyacrylamidgele zusätzlich mit 5,0 μ l MagicMark™ [259] beladen. Dieser Proteinmassenstandard enthält rekombinante Proteine, an die eine IgG Bindungsstelle gekoppelt ist, die von Sekundärantikörpern in einem Western Blot erkannt wird.

Tab. 20: Primärantikörper für die Verwendung im Western Blot. Verdünnungen der Antikörper werden entweder in Pierce® Protein-free T20 (PBS) Blocking Buffer oder in 1x PBS-T angesetzt und bei 4°C gelagert. Die angegebene Fragmentgröße bezieht sich auf die Molmasse der antigenenthaltenden, denaturierten Untereinheit des Proteins.

Primärer Antikörper	Abkürzung	Wirt	Fragmentgröße	Verdünnung
Anti-Hsp60 antibody	rb- α -Hsp60	Kaninchen	60 kDa	50 ng/ml
Rabbit anti NDUFS1 Polyclonal antibody	rb- α -Ndufs1	Kaninchen	75 kDa	167 ng/ml
Mouse-anti-OxPhos Complex V subunit alpha	ms- α -ATPA	Maus	54 kDa	1,0 μ g/ml
Anti-ATPB antibody	ms- α -ATPB	Maus	52 kDa	500 ng/ml
Mouse anti Human Amyloid beta 8G7	ms- α -A β ₁₋₄₂	Maus	4,5 kDa	1,0 μ g/ml
Anti-MTCO1 antibody	ms- α -MTCO1	Maus	40 kDa	500 ng/ml
Anti-SDHA antibody	ms- α -SDHA	Maus	70 kDa	100 ng/ml
Anti-UQCRC2 antibody	ms- α -UQCRC2	Maus	49,5 kDa	1,0 μ g/ml
VDAC1 (C-20)	gt- α -VDAC1	Ziege	30-35 kDa	400 ng/ml

Tab. 21: Sekundärantikörper für die Verwendung im Western Blot. Verdünnungen der Antikörper werden entweder in Pierce® Protein-free T20 (PBS) Blocking Buffer oder in 1x PBS-T angesetzt und bei 4°C gelagert.

Sekundärer Antikörper	Abkürzung	Wirt	Konjugat	Verdünnung
Donkey anti-mouse IgG-HRP	dy- α -ms-HRP	Esel	Meerrettichperoxidase	200 ng/ml
Donkey anti-goat IgG-HRP	dy- α -gt-HRP	Esel	Meerrettichperoxidase	80 ng/ml
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	dy- α -rb-HRP	Esel	Meerrettichperoxidase	80 ng/ml

4.24 Regeneration einer Nitrozellulosemembran

Transfermembranen (siehe 4.23) können mehrfach hintereinander mit Antikörpern inkubiert werden, wenn nach jeder Detektion die auf der Transfermembran gebundenen primären und sekundären Antikörper wieder vollständig entfernt werden [250, 285]. Die Regeneration (oder auch das *Stripping*) ermöglicht die Verwendung verschiedener Antikörperkombinationen zur Detektion eines oder mehrerer Proteine auf nur einer Transfermembran. Allerdings ist ein quantitativer Vergleich der Proteine vor und nach der Regeneration nicht möglich, da selbst unter milden Bedingungen nicht nur Antikörper, sondern auch ein Teil der Proteine von der Transfermembran abgelöst werden.

Zur Entfernung gebundener Antikörper wird die Membran 2x für je 5-10 min bei RT mit einem milden *Stripping* Puffer inkubiert. Anschließend wird sie zunächst 2x für je 10 min mit 1x PBS und dann 2x für je 5 min mit 1x PBS-T gewaschen. Nach dem Absättigen unspezifischer Bindungen mit Blockpuffer kann die Transfermembran erneut mit Antikörpern inkubiert werden.

4.25 OxyBlot™

Proteinmodifikationen durch freie Sauerstoffradikale und andere reaktive Spezies werden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kits nach Angaben des Herstellers [286] identifiziert und quantifiziert. Das Prinzip beruht dabei auf der Derivatisierung von Carbonylgruppen (Ketone, Aldehyde) in Proteinseitenketten (bevorzugt von Lysinen) zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon (siehe Abb. 34), die immunochemisch detektiert werden [286].

Es werden 20 μ g isolierte Mitochondrien (siehe 4.16.1) auf Eis aufgetaut und für 8 min bei 20.800x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in 5,0 μ l MilliQ-Wasser resuspendiert und mit 12% SDS-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 6,0% sowie mit 5,0 μ l 1x DNPH-Lösung versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT werden dem Ansatz 7,5 μ l 1x Neutralisationslösung sowie β -Mercaptoethanol mit einer Endkonzentration von 740 mM hinzugefügt. Als Negativkontrolle dient eine Mitochondrienprobe, bei der anstelle von 1x DNPH-Lösung 1x Derivatisationskontrolllösung verwendet wird.

Für die Positivkontrolle (PK) wird BSA in Puffer für Positivkontrolle gelöst (10 mg/ml), für 5 h bei 37°C inkubiert und Fe^{3+} Ionen werden anschließend durch Dialyse (Membran mit

12-16 kDa *cut-off*) über Nacht entfernt (1,0 ml oxidierte Proteinlösung pro 1,0 l Dialysepuffer). Die PK wird bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Anwendung im OxyBlot™ werden 5,0 µg (0,5 µl) BSA mit jeweils 0,5 µl MilliQ-Wasser und 12% SDS-Lösung sowie mit 1,0 µl 1x DNPH-Lösung (PK) bzw. 1x Derivatisationskontrolllösung (NK) gemischt, 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit 0,75 µl 1x Neutralisationslösung sowie β-Mercaptoethanol mit einer Endkonzentration von 740 mM versetzt.

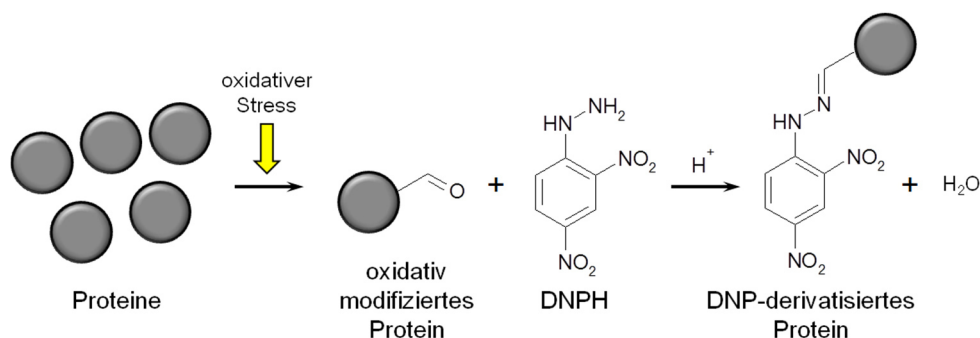


Abb. 34: OxyBlot™ - Derivatisierung oxidativ modifizierter Proteine. Durch oxidativen Stress können Proteine an ihren Seitenketten modifiziert werden. 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) reagiert mit Carbonylgruppen in Proteinseitenketten zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon (DNP-derivatisiertes Protein), welches im OxyBlot™ immunochemisch detektiert wird. (Abb. erstellt nach Cheng et al. [287]).

Die Proben (28 µl/Spur), die Negativkontrollen der Proben (28 µl/Spur) und die Positivkontrolle (3,0 µl/Spur) werden elektrophoretisch in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 4.21.1). Als Proteinmassenstandard werden auf das Gel PageRuler™ [257, 258] und MagicMark™ [259] (je 5,0 µl/Spur) geladen. Nach Beendigung der Elektrophorese wird ein Western Blot durchgeführt (siehe 4.23). Die denaturierten Proteine werden für 50 min bei 18 V auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und dort mittels Ponceau S sichtbar gemacht (siehe 4.26.4). Das Blocken findet anschließend für 30-60 min in 1,0% BSA/PBS-T statt. DNP-derivatisierte Proteine werden immunochemisch nachgewiesen (Primärantikörperinkubation: rb-α-DNP 1:500 in 1,0% BSA/PBS-T ON bei 4°C, Sekundärantikörperinkubation: dy-α-rb-HRP 1:5.000 in 1,0% BSA/PBS-T für 1,5 h bei RT, ECL-Detektion siehe 4.23). Abschließend werden die oxidierten Proteine auf der Transfermembran mittels der Software ImageJ quantifiziert, indem um jede Spur eine sogenannte *Region of Interest* (ROI) gelegt wird, mit deren Hilfe der mittlere Grauwert einer jeden Spur bestimmt wird.

4.26 Proteinfärbungen

4.26.1 Kolloidale Coomassiefärbung

Proteinbanden in einem Polyacrylamidgel können mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau sichtbar gemacht werden. Im Rahmen dieser Arbeit geschieht dies mit kolloidalem CBBG (siehe Neuhoﬀ et al. [288], modifiziert durch Kang et al. [289]), wodurch eine höhere Sensitivität im Vergleich zur gewöhnlichen Coomassiefärbung erreicht wird, die sich im

Bereich der Silberfärbung befindet [250]. Aufgrund seiner kolloidalen Eigenschaften bindet der Farbstoff mit hoher Spezifität an Proteine und kaum an die Gelmatrix [250].

Polyacrylamidgele (siehe 4.21) werden im Anschluss an die Elektrophorese zur Entfernung von Detergenzien für 10 min in dest. VE-Wasser (oder Roti®-Blue Entfärbelösung) geschwenkt und dann über Nacht bei RT in 1x Roti®-Blue Färbelösung. Anschließend wird so lange mit wechselnden Roti®-Blue Entfärbelösungen inkubiert, bis sich der Hintergrund komplett entfärbt hat. Die gefärbten Proteine werden mit dem Gelscanner ViewPix 900 dokumentiert (Auflösung 600 dpi, 24 bit Farbtiefe, TIFF-Dateiformat).

4.26.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung wird verwendet um auch geringe Proteinmengen in einem Polyacrylamidgel sichtbar zu machen. Allerdings handelt es sich um keine quantitative Methode, weil gleiche Mengen verschiedener Proteine mit unterschiedlichen Intensitäten gefärbt werden [290]. Das Färbeprinzip beruht darauf, dass sich Silberionen an Glutamat-, Aspartat- und Cysteinreste der Proteine anlagern und sich durch deren anschließenden Reduktion zu elementarem Silber ein brauner bis schwarzer Niederschlag bildet [250].

In der vorliegenden Arbeit wird die Silberfärbung nach Blum [291] durchgeführt, weil sie kompatibel mit nachfolgenden massenspektrometrischen Analysen ist (siehe 4.28). Das Polyacrylamidgel wird zunächst in Fixierer I und dann in Fixierer II für jeweils mind. 1 h bei RT geschwenkt. Anschließend wird für 1 min mit Sensitizer inkubiert, 2x für je 1 min mit dest. VE-Wasser gewaschen und für 20 min in Silberlösung geschwenkt. Nach einem 1-minütigen Waschschrift wird das Polyacrylamidgel so lange in Färbelösung inkubiert, bis die gewünschte Färbintensität erreicht ist. Anschließend wird das Gel erneut für 1 min gewaschen und die Reaktion durch 10-minütiges Schwenken in Stopplösung beendet. Die gefärbten Proteine werden mit dem Gelscanner ViewPix 900 dokumentiert (Auflösung 600 dpi, 24 bit Farbtiefe, TIFF-Dateiformat). Das Polyacrylamidgel wird dann entweder in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert oder es wird bis zur weiteren Verwendung in Lagerlösung bei 4°C schwenkend aufbewahrt.

4.26.3 SYPRO® Ruby Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby (ex/em 280 + 470 nm/618 nm) ist ein Ruthenium-Chelatkomplex, der selektiv an basische Aminosäuren und an das Peptidrückgrat bindet [292]. Die Färbung zeichnet sich durch einen sehr weiten linearen quantitativen Proteinkonzentrationsbereich (10^3) aus [250, 293] und ist dabei fast so sensitiv wie die Silberfärbung [250].

Im Anschluss an eine Elektrophorese (siehe 4.21) werden Polyacrylamidgele für mind. 1 h bei RT in SYPRO® Ruby Fixierlösung geschwenkt, bevor sie für 3 h bei RT unter Lichtausschluss und leichtem Schütteln mit SYPRO® Ruby Färbelösung inkubiert werden. Danach werden die Gele für 10 min in SYPRO® Ruby Fixierlösung, gefolgt von 5 min in MilliQ-Wasser jeweils unter Lichtausschluss geschwenkt.

Zur Dokumentation fluoreszenzgefärbter Proteine im Gel wird eine CCD-Kamera (*Imaging System LAS-3000*) mit folgenden Einstellungen verwendet: blaue LED Lichtquelle (460 nm), 605 nm Emissionsfilter (605DF40), Blende $F=0,85$, Intervall 10 s. Es werden so lange Bilder im Intervall von 10 s aufgenommen, bis das Signal gesättigt ist. Dieses Bild wird im TIFF-Dateiformat gespeichert.

4.26.4 Ponceau S Färbung

Die Ponceau S Färbung ist eine schnelle, reversible Methode zur Färbung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Nachweisgrenze 50 ng/Bande), womit die Bloteffizienz (siehe 4.23) überprüft wird [250]. Der rote Azofarbstoff bindet dabei an positiv geladene Aminogruppen der Proteine sowie nichtkovalent an unpolare Regionen. Die Färbung ist sehr leicht mit Wasser auszuwaschen, wodurch die Transfermembran im Anschluss für die Immun-detektion mit Antikörpern verwendet werden kann (siehe 4.23) [294].

Nach dem Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (siehe 4.23) wird die Transfermembran für ca. 1 min in Ponceau S Färbelösung geschwenkt und dann so lange mit dest. VE-Wasser entfärbt, bis der Hintergrund wieder weiß ist. Die angefärbten Proteinbanden können dann mit dem Gelscanner ViewPix 900 dokumentiert werden (Auflösung 600 dpi, 24 bit Farbtiefe, TIFF-Dateiformat). Anschließend wird die Transfermembran bis zur vollständigen Entfärbung in dest. VE-Wasser geschwenkt.

4.27 Quantitative Proteomanalyse

Die quantitative Proteomanalyse wird mit der Software Delta2D nach Angaben des Herstellers [274, 275, 295] durchgeführt. Sie ermöglicht es, identische Proteinspots auf unterschiedlichen Bildern von 2D-BN/SDS-Gelen anhand ihrer Grauwerte zu quantifizieren und somit Informationen über die Menge eines Proteins zu erhalten. Die Identifizierung der zu quantifizierenden Proteinspots erfolgt durch Massenspektrometrie mit anschließendem Peptidmassenfingerprint (siehe 4.28).

Zunächst werden SYPRO® Ruby gefärbte 2D-BN/SDS-Gelbilder (siehe 4.21.3 und 4.26.3) in ein neues Projekt innerhalb der Software importiert, wobei alle biologischen Replikate einer Behandlungsart in derselben Gruppe zusammengefasst werden. Ziel ist es nun alle importierten Bilder so übereinanderzulegen, dass identische Spots auf unterschiedlichen Gelen übereinander liegen. Dies geschieht beim sogenannten *Warping* durch die Verknüpfung identischer Proteinspots mit mathematischen Vektoren (*match vectors*). Das *Warping* folgt dabei der *Group Warping Strategy*. Das bedeutet, dass das erste Gelbild einer jeden Gruppe als Referenzbild angesehen wird, auf das alle Gelbilder einer Gruppe *gewarpt* werden. Zusätzlich werden die Referenzbilder unterschiedlicher Gruppen aufeinander *gewarpt*. Die Software generiert anschließend ein Überlagerungsbild aus allen Gelbildern, das sogenannte Fusionsgel. Auf diesem Fusionsgel werden die zu quantifizierenden Proteinspots markiert (*mark spot*) und nummeriert. Zudem werden alle anderen Proteinspots markiert und in den Hintergrund gebracht (*hide spot*). Farbflecken der SYPRO® Ruby Färbung werden entfernt (*cancel spot*).

Um die Spotgrenzen genau festlegen zu können, wird jeder Spot mit dem *3D Tool* einzeln aufgerufen und begutachtet. Anschließend werden alle markierten Spots auf dem Fusionsgel auf die einzelnen Gelbilder transferiert. Die Software quantifiziert nun die Grauwerte aller Pixel innerhalb einer jeden Spotmarkierung als absolutes Grauwertpixelvolumen V eines jeden Spots. Im Hintergrund wird das totale absolute Grauwertvolumen aus allen markierten Spots (*marked spots* und *hide spots*) kalkuliert. Der Quotient aus dem absoluten Grauwertpixelvolumen V und dem totalen absoluten Grauwertvolumen ergibt das relative Grauwertpixelvolumen $V\%$ für jeden Spot. $V\%$ ist direkt proportional zur Proteinmenge eines Spots. Für jede Gruppe werden die Mittelwerte der erhaltenen $V\%$ -Werte für jeden Spot gebildet und graphisch aufgetragen. Abb. 35 zeigt am Beispiel von BHM die quantitative Proteomanalyse mittels der Software Delta2D.

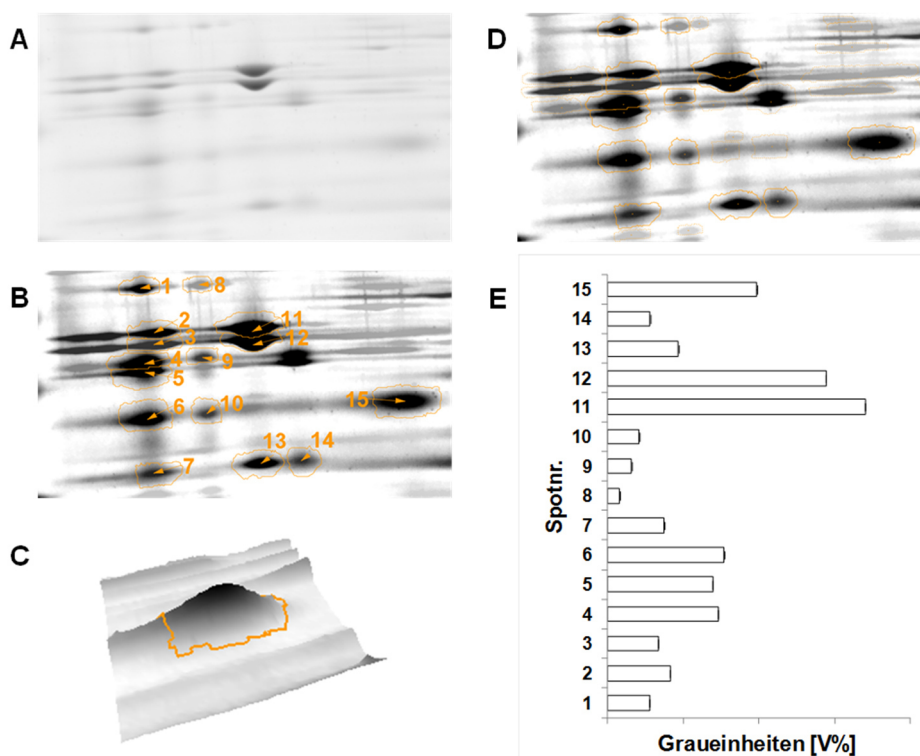


Abb. 35: Quantitative Proteomanalyse mittels der Software Delta2D am Beispiel von BHM. Nach einer 2D-BN/SDS-PAGE werden (A) mit SYPRO® Ruby gefärbte 2D-Gele im TIFF-Datei-format in die Software importiert und in Gruppen angeordnet. (B) Durch sogenanntes *Warping* entsteht ein Fusionsgel, das eine exakte Überlagerung aller Gelbilder darstellt. Auf diesem werden die zu quantifizierenden Spots orange markiert und nummeriert. (C) Jeder Spot wird dazu in 3D dargestellt, um die Spotgrenzen genau festlegen zu können. (D) Proteinspots, die nicht quantifiziert werden sollen, werden ebenfalls markiert (orange gestrichelt), wodurch sie für die Ermittlung des Gesamtgrauwertes des Gels herangezogen werden. (E) Quantifiziert werden die Grauwertpixelvolumen eines jeden Spots als Anteil am Gesamtgrauwertpixelvolumen aller Spots des Gels ($V\%$). $V\%$, proportional zur Proteinmenge eines Spots, wird graphisch aufgetragen.

4.28 Massenspektrometrie und Peptidmassenfingerprint

Die Massenbestimmung eines unbekannten Proteins und seine anschließende Identifikation erfolgt mittels Massenspektrometrie und Peptidmassenfingerprint (*peptide mass fingerprint*, PMF). Dafür wird ein Proteingemisch elektrophoretisch aufgetrennt und das unbekannte Protein im Gelspot tryptisch verdaut. Trypsin spaltet dabei spezifisch nach der carboxyterminalen Seite von Lysin- und Argininresten, wenn anschließend kein Prolinrest folgt. Die so entstandenen Peptide eines Proteinspots werden dann nach Extraktion aus dem Gel in einem Massenspektrometer gemessen, wodurch ihre absoluten Massen bestimmt werden, die dann mit theoretischen Peptidmassen in einer Datenbank (z.B. Mascot von Matrix Science) abgeglichen werden. Bereits die Massen von drei Peptiden charakterisieren ein Protein fast so eindeutig wie seine Aminosäuresequenz [250].

In der vorliegenden Arbeit wird ein Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionisation (MALDI) Flugzeitanalysator (*time of flight*, TOF) Massenspektrometer (MS), kurz MALDI-TOF-MS, verwendet. Die eluierten Peptide werden auf einem Probenhalter (*target*) mit der lichtabsorbierenden und Elektronen transferierenden Matrix (z.B. α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure, HCCA) kokristallisiert. Im MS werden die Peptide ionisiert und in die Gasphase überführt, indem ein Laser die Matrixmoleküle anregt, wodurch Energie und Protonen auf die Peptide übertragen werden. Vor dem Eintritt in das Vakuum-Flugrohr (Flugzeitanalysator) werden die geladenen Peptide in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Ionen fliegen so abhängig von ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) mit einer definierten Geschwindigkeit durch das Flugrohr. Der Detektor misst die Flugzeit eines jeden Ions und daraus kalkuliert die Software das spezifische m/s für jedes Ion, das gegen die Intensität aufgetragen wird [238, 250].

Für MS-Analysen werden große 2D-BN/SDS-Gele (siehe 0 und 4.21.3), die silbergefärbt sind (siehe 4.26.2), verwendet. Die zu identifizierenden Proteinspots werden mit einer Hautstanze aus dem Gel ausgeschnitten und in je eine Kavität einer 96-*well* Platte mit V-Boden abgelegt. Der V-Boden einer jeden Kavität enthält ein Loch mit einem Durchmesser von 0,8 mm (Anfertigung durch Mechanikwerkstatt des FB Chemie der TU Darmstadt). Den Gelstücken werden je 10 μ l MilliQ-Wasser hinzugefügt, um deren Austrocknung zu vermeiden. Nachdem alle zu analysierenden Proteinspots ausgeschnitten sind, wird das Wasser durch Zentrifugation für 2 min bei 165x g und RT entfernt (fließt durch Loch im Boden der Kavität). Die Proteinspots werden dann so lange mit 30 mM Kaliumhexacyanoferrat (oxidiert Silber) und 100 mM Natriumthiosulfat (komplexiert Silberionen) inkubiert, bis die Silberfärbung vollständig entfernt ist (Gelstücke färben sich gelblich). Die Flüssigkeit wird durch Zentrifugation für 2 min bei 165x g und RT entfernt. Anschließend wird so lange mit MilliQ-Wasser gewaschen, bis die Gelstücke farblos sind. Um die Austrocknung zu verhindern werden erneut 20 μ l MilliQ-Wasser auf jedes Gelstück pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird gut verschlossen bei 4°C aufbewahrt.

Alle weiteren Schritte werden am Deutschen Diabetes-Zentrum Düsseldorf in der Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Lehr unter Anleitung von Dr. Sonja Hartwig durchgeführt (teilweise von mir und teilweise von meinen Kollegen Manuela Kratochwil und Sven Marx). Die Gelstücke werden zunächst abwechselnd je 3x für je 10 min mit 25 mM Ammoniumbicarbonat

(Hydrierung) und 50% (v/v) Acetonitril/25 mM Ammoniumbicarbonat (Dehydrierung) inkubiert. Danach werden die Gelstücke für 10 min mit Acetonitril dehydriert. Anschließend wird die Flüssigkeit vollständig entfernt. Der tryptische Verdau der Proteinspots findet über Nacht (mind. für 4 h) bei 37°C in Trypsinarbeitslösung statt. Zur Extraktion der Peptide werden 1,0% (v/v) TFA in jede Kavität gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Die Proben werden dann auf den Probenhalter (HCCA Prespotted AnchorChip (PAC) II Target) nach der HCCA *Affinity Preparation* Technik des Herstellers Bruker Daltonik [296] aufgetragen.

MS-Analysen werden von Dr. Sonja Hardwig am MALDI-TOF/TOF MS Ultraflex I durchgeführt. Die vorgenommenen Einstellungen können Tab. 22 entnommen werden. Der verwendete Probenhalter enthält bereits einen externen Kalibrierungsstandard (siehe Tab. 23) [296] und Trypsinpeaks dienen als interner Standard. Kalibrierte Spektren werden automatisch mit der Software Compass gespeichert. Die Software ProteinScape konvertiert die Spektren in Peaklisten mit monoisotopischen Massen und startet automatisch die Durchsuchung der Mascot Datenbank (Suchparameter siehe Tab. 24).

Tab. 22: Einstellungen für MALDI-TOF/TOF MS Messungen.

Einstellungen am MALDI-TOF/TOF MS Ultraflex I	
instrument mode	reflector, positive
shots / spectrum	sum up 600 in 100 shot steps (fuzzy logic)
mass range / Da	680-4000, peak selection for evaluation (900 to 2300)
low mass gate / Da	680
calibration, matrix	PAC II, HCCA
laser frequency	50 Hz
laser intensity	automatically adapted by fuzzy logic control module

Tab. 23: Massen des externen Kalibrierungsstandards auf dem Probenhalter HCCA PAC II.

Protein	monoisotopische Masse
Calibrant 1	757,39916 Da
Calibrant 2	1.046,54180 Da
Calibrant 3	1.296,68480 Da
Calibrant 4	1.672,91700 Da
Calibrant 5	1.758,93261 Da
Calibrant 6	2.016,98860 Da
Calibrant 7	2.406,28880 Da
Calibrant 8	2.981,58570 Da
Calibrant 9	3.574,87650 Da

Tab. 24: Suchparameter für den Peptidmassenfingerabdruck.

Suchparameter für die Peptididentifikation		
database	SwissProt	
enzyme	trypsin, allow up to 1 missed cleavages	
taxonomy	<i>Rattus norvegicus</i> (RAT)	für OLN-93
	<i>Homo sapiens</i> (HUMAN)	für SH-SY5Y
fixed modifications	none selected	
variable modifications	Oxidation (M)	
	Carbamidomethyl (C)	
peptide tolerance	± 100 ppm	
significance threshold	p < 0.05	
mass values	MH ⁺	monoisotopic

4.29 Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit graphisch aufgetragenen Daten stellen immer den Mittelwert (MW) plus/minus die Standardabweichung (\pm Stabw) dar. Die Mittelwerte beziehen sich dabei auf biologische (gekennzeichnet mit "N") oder technische (gekennzeichnet mit "n") Replikate. Als Signifikanztest zum Vergleich zweier Mittelwerte wird der *Student's t*-Test für zwei unverbundene Stichproben gewählt. Beim *t*-Test handelt es sich um einen parametrischen Test, der theoretisch normalverteilte Grundgesamtheiten voraussetzt. Allerdings ist der *t*-Test ziemlich unempfindlich gegenüber Abweichungen von der Normalverteilung [297]. Statistisch signifikante Unterschiede werden erhalten, wenn der p-Wert (*probability-value*, *p-value*, siehe Tab. 25) kleiner als das Signifikanzniveau α ist und somit die Nullhypothese H_0 ($\mu_1^2 = \mu_2^2$) abgelehnt wird. Da der p-Wert eine Wahrscheinlichkeit ist, nimmt er Werte zwischen null und eins an [297].

Tab. 25: P-Werte, ihre Bedeutung für die Signifikanz sowie die symbolische Kennzeichnung der p-Werte, wie sie in der vorliegenden Arbeit in Diagrammen zu finden ist.

p-Wert	Bedeutung	Kennzeichnung
$p \leq 0,1$	schwach signifikant	#
$p \leq 0,05$	signifikant	★
$p \leq 0,01$	hochsignifikant	★★
$p \leq 0,001$	höchstsignifikant	★★★

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Ausgangssituation

Das Alter ist ein wesentlicher Risikofaktor für die Erkrankung an Alzheimer Demenz. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung durch weltweit verbesserte Lebensbedingungen wird es zu einem großen Anstieg der Krankenzahlen kommen (siehe Abb. 1). Die Behandlung und Pflege von Alzheimerpatienten ist mit erheblichen finanziellen und sozialen Belastungen für die Gesellschaft verbunden [11, 12]. Um diese Belastungen (für Patienten, Angehörige und die Gesellschaft) zu minimieren, ist es dringend erforderlich Präventionsmöglichkeiten und Therapien zu entwickeln. Gegenwärtig verfügbare Alzheimermedikamente können nämlich lediglich mit mäßigem Erfolg die Symptome behandeln.

AD ist durch eine langsam fortschreitende Neurodegeneration gekennzeichnet, wodurch kognitive Funktionen unwiederbringlich verloren gehen [12]. Das posttranslational aus dem amyloiden Vorläuferprotein APP generierte A β Peptid spielt eine zentrale Rolle bei der AD Pathogenese [1, 2]. Jüngste Erkenntnisse benennen intraneuronal vorkommende A β Mono- und Oligomere (Di- und Trimere sowie höhere Oligomere) als pathogene Formen des Peptids (Oligomer-Hypothese) [3-7]. In der Tat werden im humanen Gehirn hauptsächlich A β Dimere [100] der Isoform A β ₁₋₄₂ [101] gefunden. Infolge der A β Neurotoxizität kommt es zu neuronalen Dysfunktionen vornehmlich der Synapsen, die zum Zelltod führen [3]. Die in den Synapsen konzentrierten Mitochondrien weisen bereits in der sehr frühen Phase der AD Pathogenese Dysfunktionen wie eine abnormale Dynamik und gestörte Biogenese auf [10]. Nicht-erfolgreiche, klinische Studien zur passiven Immuntherapie führten zu der Erkenntnis, dass zukünftige Studien bereits bei den frühesten klinischen Symptomen oder noch davor ansetzen müssen, um die irreversiblen Vorgänge, die zum Nervenzellsterben führen, verhindern zu können [188]. Daher wird in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von A β ₁₋₄₂ Mono- und Oligomeren auf Mitochondrien eingehend untersucht, weil davon ausgegangen wird, dass sie eine signifikante Funktion in der Anfangsphase der AD Pathogenese einnehmen.

Der Versuchsaufbau sah vor OLN-93 und SH-SY5Y Zellen extern mit oligomeren A β ₁₋₄₂ Peptiden zu behandeln und Effekte auf Zellphysiologie und Mitochondrien zu analysieren. Die Zellphysiologie sollte anhand der metabolischen und lysosomalen Aktivität sowie der Anzahl apoptotischer/nekrotischer Zellen untersucht werden. Für eine physiologische Zellfunktion ist ebenfalls die Aufrechterhaltung der Redox Homöostase (Gleichgewicht zwischen Oxidations- und Reduktionssystemen) erforderlich. Hinweise darauf werden durch die Bestimmung der Menge Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erhalten. Eine Folge von vermehrter Entstehung von ROS sind u.a. Proteinmodifikationen, die ebenfalls analysiert werden sollten. Proteinmodifikationen in Form von oxidierten Aminosäureseitenketten können in Proteinfehlfunktionen resultieren. Kommen diese Fehlfunktionen an Atmungskettenkomplexen vor, kann dies der Auslöser von vermehrter ROS Generierung sein. Darüber hinaus können oxidierte Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe zu einer veränderten Aktivität führen, was sich auf die oxidative Phosphorylierung auswirken kann. Aus diesem

Grund sollten in der vorliegenden Arbeit die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe genauer untersucht werden. Eine Änderung der Aktivität der Atmungskettenkomplexe würde sich auf das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) auswirken und das wiederum auf die ATP Synthese. Aus Abweichungen der ATP Syntheserate können sich direkte Konsequenzen für die gesamte Zelle ergeben, wenn z.B. nicht ausreichend ATP für energieverbrauchende Prozesse zur Verfügung gestellt werden kann. Untersuchungen des Effekts von A β ₁₋₄₂ auf das MMP und die ATP Konzentration sind daher von großer Bedeutung. ROS kann aber auch zu DNA-Schäden führen. Proteomanalysen sollen daher Aufschluss darüber geben, ob Proteine mit allen benötigten Untereinheiten vorhanden sind. Darüber hinaus lässt sich über eine Quantifizierung des Proteoms auf die Proteinmenge schließen, da nicht auszuschließen ist, dass A β Peptide die Proteinexpression beeinflussen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen dienen dazu die AD Pathogenese besser zu verstehen. Dabei liegt der Fokus auf A β -induzierten mitochondrialen Dysfunktionen, weil diese bereits in der Anfangsphase der AD Pathogenese auftreten. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen die molekularen Mechanismen der Entstehung dieser Krankheit aufzudecken um Präventionsmöglichkeiten und Therapien entwickeln zu können. Zudem ist eine möglichst frühe Diagnose von großer Bedeutung, weil bereits bestehende kognitive Defizite nicht mehr rückgängig gemacht werden können, wenn signifikanter neuronaler Schaden bereits besteht. Darüber hinaus müssen klinische Studien so früh wie möglich in der AD Pathogenese ansetzen, damit eines Tages die irreversiblen Vorgänge, die zum Nervenzellsterben führen, verhindert werden können.

5.2 Charakterisierung von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen

Da die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y ein Standardmodellsystem zur *in vitro* Untersuchung der Alzheimer Demenz ist, wurde sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit von mir in der Arbeitsgruppe Dencher etabliert und mit der bereits etablierten Ratten-Oligodendrozytenzelllinie OLN-93 verglichen. OLN-93 Zellen werden als *in vitro* Modellsystem für Oligodendrozyten herangezogen und in der vorliegenden Arbeit erstmalig für die Alzheimerforschung verwendet. Somit wird in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von A β ₁₋₄₂ auf neuronale Zellen und Oligodendrozyten diskutiert.

5.2.1 Wachstumsverhalten

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens dient der Charakterisierung einer unbekannten Zelllinie. Für spätere Experimente war es von großer Bedeutung das Wachstumsverhalten genau zu kennen, um frühzeitig experimentell bedingte oder durch andere Einflüsse herbeigeführte Abweichungen vom Normverhalten feststellen zu können.

Es wurden $6,25 \times 10^3$ Zellen pro cm² Wachstumsfläche in 6-well Platten ausgesät, im Brutschrank bei 37°C kultiviert und alle 24 h wurde die Zellzahl pro cm² Wachstumsfläche bestimmt (siehe 4.5). Sowohl OLN-93 als auch SH-SY5Y Zellen wiesen einen typischen Wachstumskurvenverlauf auf, der sich in Latenz-, exponentielle, Plateau- und Absterbephase unterteilen ließ (siehe Abb. 36). Die Latenzphase betrug bei beiden Zelllinien etwa 24 h. Nach

dieser Zeit waren sie wieder vollständig adhärirt und hatten ihre normale Stoffwechseltätigkeit wieder aufgenommen, wodurch sie sich ab diesem Zeitpunkt exponentiell vermehrten. Das exponentielle Wachstum der OLN-93 Zellen trat ungefähr 120 h nach der Zellaussaat langsam in die Plateauphase über, die wiederum nach 168 h in die Absterbephase mündete. Bei den SH-SY5Y Zellen war das exponentielle Wachstum etwas länger, der Übergang in die Plateauphase fand 120 bis 144 h nach der Zellaussaat statt. Die Absterbephase begann ungefähr 192 h nach der Zellaussaat.

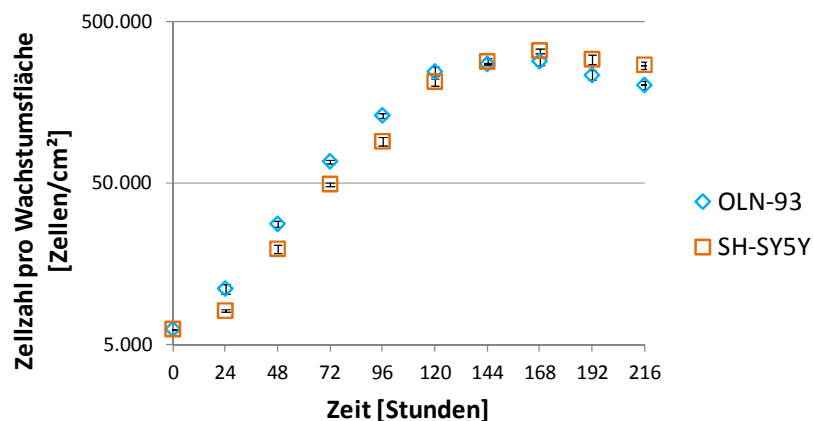


Abb. 36: Wachstumskurve von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen. Nach einer 24-stündigen Latenzphase traten beide Zelllinien in die exponentielle Wachstumsphase ein, die ungefähr 144 h nach der Zellaussaat in die Plateauphase überging und von da aus in die Absterbephase. Die Populationsverdopplungszeit betrug 21,5 h für OLN-93 Zellen und 20,6 h für SH-SY5Y.

Anhand der Steigung innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Populationsverdopplungszeit für beide Zelllinien bestimmt. Sie betrug für OLN-93 Zellen 21,5 h und für SH-SY5Y Zellen 20,6 h. In der Literatur [200] wird für OLN-93 Zellen eine Populationsverdopplungszeit von 16-18 h angegeben. Der kleinere Wert wurde wahrscheinlich durch einen regelmäßigen Mediumwechsel (3x wöchentlich) erzielt, wodurch kein Nährstoffmangel entstehen konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens über die gesamte Zeit kein Mediumwechsel vorgenommen. Mit zunehmender Konfluenz dürften daher die für die Proliferation benötigten Nährstoffe immer weniger geworden sein und schädliche Abfallstoffe reicherten sich an. Erstaunlich war jedoch, dass meine Kollegin Lidija Cavlovic eine Verdopplungszeit von 11,6 h für OLN-93 ermittelt hat [298], obwohl die gleiche methodische Durchführung angewandt wurde. Diese Diskrepanz erklärt sich zum einen durch die Verwendung von unterschiedlichem FBS im DMEM-Vollmedium und zum anderen durch eine fehlerhafte Berechnung der Verdopplungszeit ihrerseits. Die Verwendung von FBS unterschiedlicher Hersteller, aber auch verschiedener Chargen hat mit hoher Wahrscheinlichkeit große qualitative und quantitative Schwankungen in der Zusammensetzung der Seren zur Folge. Diese begründen sich auf die unterschiedliche geographische Herkunft des Rohserums, jahreszeitlichen Schwankungen der Rinderpopulationen sowie unterschiedlichen Methoden der Rohserumgewinnung und Weiterverarbeitung [208]. Unterschiedliche Zusammensetzungen der Seren und damit ein verändertes Angebot an Nährstoffen wirken sich direkt auf das Wachstumsverhalten der Zellen aus. Das Alter des Serums spielt zudem eine Rolle,

weil es bei längerer Lagerung zu Qualitätsverlusten kommen kann [208]. Lidija Cavlovic verwendete das FBS unmittelbar nach dem Kauf vom Hersteller. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Ermittlung der Populationsverdopplungszeit ein FBS genutzt, das bereits ca. 1,5 Jahre im Labor bei -20°C gelagert wurde.

Für SH-SY5Y Zellen wurde eine Populationsverdopplungszeit von 48 h publiziert [207] (20,6 h in der vorliegenden Arbeit). Es ist nicht bekannt, ob während der Kultivierung ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass die Zellen in einem Medium bestehend aus 50% (v/v) *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) und 50% (v/v) *Ham's F-12 nutrient mixture* (F12) kultiviert wurden. Im Vergleich zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Medium (*advanced* DMEM) enthält EMEM/F12 eine geringere Glucosekonzentration, die ursächlich für eine niedrigere Proliferationsrate ist, weil weniger ATP produziert werden kann. Ursächlich für diesen großen Unterschied in der Populationsverdopplungszeit könnte aber auch die Methode, die zum Zählen der Zellen angewandt wurde, sein. Meine Kollegin Tamara Dzinic ermittelte für SH-SY5Y Zellen eine Populationsverdopplungszeit von 42,7 h (unpublizierte Daten). Zur Zellzahlbestimmung verwendete sie die Neubauer-Zählkammer. Unter Einsatz der Neubauer-Zählkammer wird jedoch eine sehr subjektive Einschätzung der Zellzahl erhalten, die von Experimentator zu Experimentator abweichen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zellzahl mit dem Scepter™ bestimmt und kann damit als standardisiert angesehen werden.

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens beinhaltete zudem die morphologische Begutachtung der Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte (siehe Abb. 37). Die beobachtete Morphologie von OLN-93 Zellen stimmte mit den Beschreibungen von Richter-Landsberg und Heinrich [200] sowie Kim [210] überein. Bei geringer Zelldichte waren sie hauptsächlich bipolar mit langen zellulären Fortsätzen. Mit zunehmender Zelldichte bildeten sich Klumpen, die durch dünne zelluläre Fortsätze miteinander verbunden waren. Bereits vor dem Erreichen der 100%igen Konfluenz begann die sogenannte Inselbildung. Die maximale Zelldichte wurde mit $2,8 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 Wachstumsfläche bestimmt. Die Morphologie von SH-SY5Y Zellen unterschied sich kaum von der der OLN-93 Zellen. Auffällig war jedoch, dass bei 100%iger Konfluenz nur eine geringe Inselbildung zu beobachten war. Dies könnte durch eine verminderte Kontakthemmung der Zellen durch deren Tumorausprung hervorgerufen worden sein. SH-SY5Y Zellen vermehrten sich in den ersten 24 h langsamer als OLN-93 Zellen. Dies deutete darauf hin, dass sie nach dem Aussäen einen längeren Zeitraum zur Wiederaufnahme der vollständigen Stoffwechsellätigkeit benötigten. Die maximale Zelldichte lag für SH-SY5Y Zellen bei $3,3 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 Wachstumsfläche. Der in der Literatur [207] angegebene Wert von $1,0 \times 10^6$ Zellen pro cm^2 Wachstumsfläche konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Es wird davon ausgegangen, dass die Zellen mit einer Methode, die in der vorliegenden Arbeit nicht zur Anwendung kam, gezählt wurden, was diese Abweichungen erklären könnte.

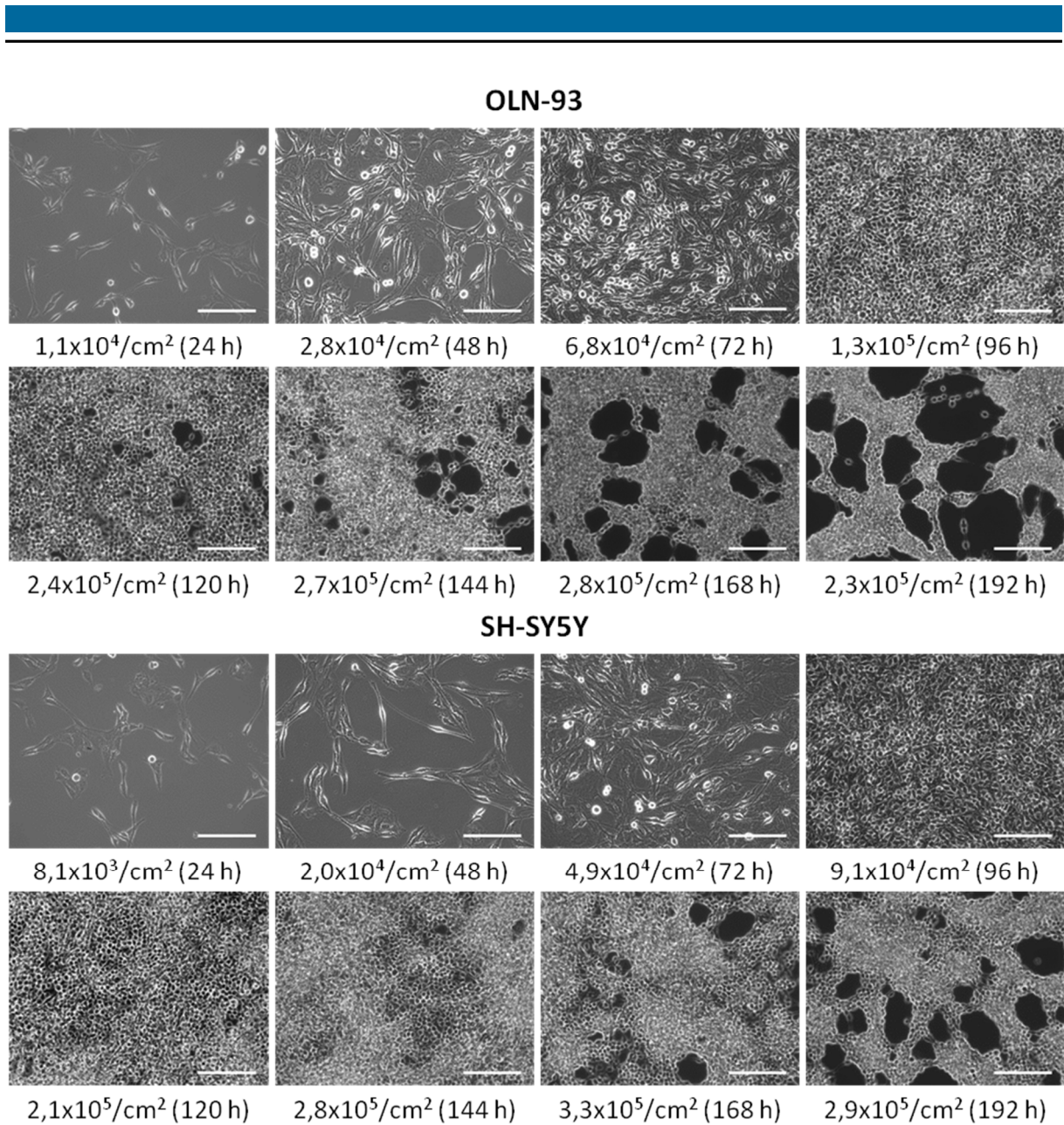


Abb. 37: Zellmorphologie in Abhängigkeit von der Zelldichte. OLN-93 und SH-SY5Y Zellen wiesen bei geringer Zelldichte lange zelluläre Fortsätze auf. Mit zunehmender Zelldichte wuchsen sie in Klumpen und es kam zur Inselbildung. (Größenmaßstab: 200 µm)

5.2.2 Optimierung gelbasierter Methoden für Zellkulturproben

In der vorliegenden Arbeit werden einige Experimente diskutiert, die auf eine native Auftrennung von Mitochondrienproteinen in BN-Gelen zurückgehen (siehe 5.3.4 und 5.3.6). Die Solubilisierung der mitochondrialen Membranproteine stellt dabei den problematischsten Faktor dar. Auch wenn das nichtionische Digitonin als mildes Detergens angesehen wird, kann es bei hohen Konzentrationen trotzdem denaturierend auf die native Konformation von Membranproteinen wirken und Assemblierungen zwischen Proteinen auflösen [253]. Um sicherzustellen, dass Experimente, bei denen eine native Auftrennung von Bedeutung ist, nicht durch denaturierte Proteine bzw. aufgelösten Assemblierungen verfälscht werden, wurde zunächst das optimale Digitonin/Protein-Verhältnis (D/P) für Mitochondrienproteine aus

OLN-93 (OLM) und SH-SY5Y (SHM) Zellen bestimmt. Dabei ergab sich das optimale D/P aus einer möglichst hohen Ausbeute bei Erhalt der Konformation in Kombination mit einer guten Bandenschärfe. In der AG Dencher war ein Wert von 8,0 g/g für Fibroblasten von Monika Frenzel etabliert worden [299], weshalb für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten neuronalen Zellen und Oligodendrozyten Werte zwischen 4,0 und 10,0 g/g getestet werden sollten. Dafür wurden 50 µg Mitochondrienproteine mit einem D/P von 4,0 bis 10,0 g/g solubilisiert, in einer BN-PAGE aufgetrennt (siehe 0) und mit Coomassie im BN-Gel sichtbar gemacht (siehe Abb. 38A). Mit zunehmendem D/P wurden im höher molekularen Bereich die Proteinbanden nach oben verschoben, weil Digitonin das Laufverhalten der Proteine beeinflusst. Zudem nahm die Bandenschärfe ab. Die definiertesten und meisten Banden konnten bei einem D/P von 4,0 g/g für OLM gefunden werden. Bei SHM lag das optimale D/P bei 6,0 g/g. Nachfolgende Experimente zeigten jedoch Sensitivitätsprobleme bei in-Gel Aktivitätstest bzw. unscharfe Banden in BN Western Blots. Es wurde vermutet, dass es an der totalen Digitoninkonzentration im Ansatz liegen könnte. Diese lag in den Experimenten bei 1,0% (OLM) bzw. 1,5% (SHM), wenn 100 µg Mitochondrienproteine eingesetzt wurden. In der Arbeitsgruppe Dencher war allerdings für Gewebeproben ein Wert von maximal 2,0% etabliert (Kommunikation innerhalb der AG Dencher). Zellkulturen tolerieren anscheinend nur kleinere Werte für die totale Digitoninkonzentration im Gesamtansatz. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde das optimale D/P erneut bestimmt. 120 µg Mitochondrienproteine wurden mit einem D/P von 2,0 bis 9,0 g/g mit einer totalen Digitoninkonzentration von 0,53 bis 2,4% solubilisiert (siehe Abb. 38B). OLM zeigten ab einem D/P von 6,0 g/g (Digitoninkonz.: 1,6%) keine klar definierten Banden im höher molekularen Bereich. Für SHM war dies ab 7,0 g/g (Digitoninkonz.: 1,87%) der Fall. Bei diesen D/P kam es demnach zu denaturierenden Effekten bzw. zur Auflösung von Proteinassamblierungen. Zudem lässt sich schließen, dass OLM sensibler gegenüber Digitonin sind als SHM. Beide Zelllinien zeigten nur wenige und schwache Banden, wenn die mitochondrialen Proteine mit einem D/P von 2,0 g/g und einer totalen Digitoninkonzentration von 0,53% solubilisiert wurden. Eine effiziente Solubilisierung war demnach nicht möglich. Daher wurde davon ausgegangen, dass ein D/P von 3,0 bis 4,0 g/g mit einer totalen Digitoninkonzentration zwischen 0,8 und 1,1% für OLM bzw. 0,8 und 1,4% für SHM optimal für die native Auftrennung ist. Für nachfolgende Experimente, die eine BN-PAGE beinhalten (mittelgroße Gele), wurde sich für ein D/P von 3,0 g/g mit einer totalen Digitoninkonzentration von 0,9% entschieden.

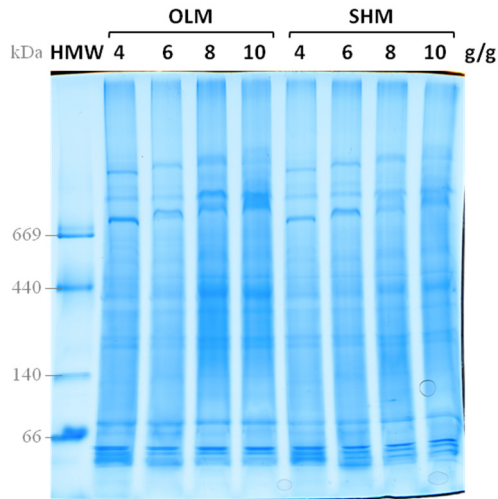
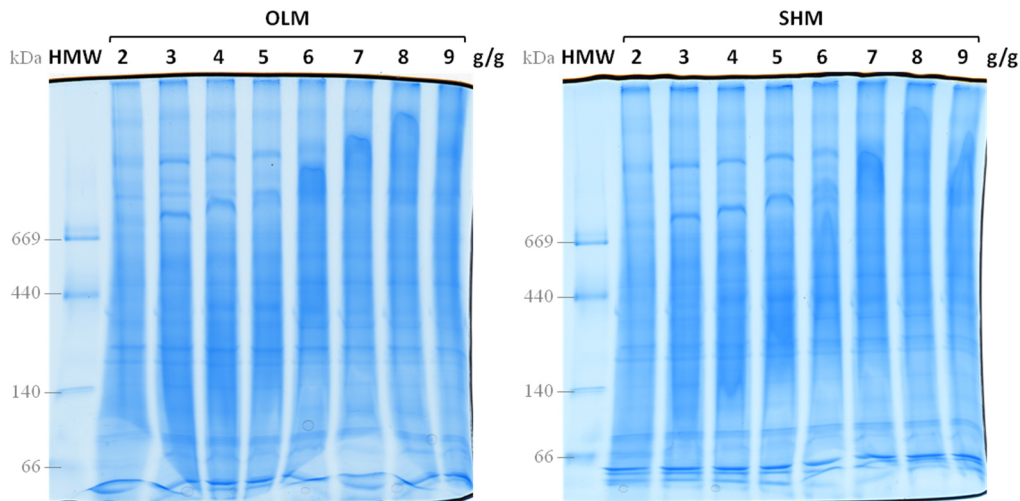
A**B**

Abb. 38: Etablierung des optimalen Digitonin/Protein-Verhältnisses für die native Auftrennung von Mitochondrienproteinen aus OLN-93 (OLM) und SH-SY5Y (SHM) Zellen. (A) Für 50 µg Mitochondrienproteine aus OLM wurde ein optimales D/P von 4,0 g/g bestimmt, für SHM eins von 6,0 g/g. (B) Sensitivitätsprobleme in nachfolgenden Experimenten führten zur Verwendung einer höheren Proteinkonzentration (120 µg), für die ein optimales D/P von 3,0 bis 4,0 g/g für beide Zelllinien bestimmt wurde.

Die durch die native Auftrennung von BHM erhaltenen Banden im BN-Gel sind in der Arbeitsgruppe Dencher gut charakterisiert. Um die für OLM und SHM erhaltenen Banden mitochondrialen Proteinen zuordnen zu können, etablierte ich BN Western Blots (siehe 4.23). Dafür wurden entweder 100 µg (D/P: 4,0 g/g für OLM, 6,0 g/g für SHM) oder 120 µg (D/P: 3,0 g/g) Mitochondrienproteine solubilisiert, in einer BN-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend mittels Antikörpern spezifisch für jeweils einen der fünf Atmungskettenkomplexe immunochemisch nachgewiesen (siehe Abb. 39A-E und 7.4.1). 30 µg BHM dienen zum einen als Referenz und zum anderen als Proteinmassenstandard. Für die Komplex I Untereinheit Ndufs1 wurde für beide Zelllinien eine Bande auf Höhe von I₁IV₂ von BHM detektiert, sowie eine eher verschmierte Bande auf Höhe von I₁III₂IV₂ (siehe Abb. 39A). Bei der unteren Bande könnte es sich um den individuellen Komplex I (I₁) handeln und

bei der oberen um die Superkomplexbande, die I_1III_2 bis $I_1III_2IV_3$ vereint. Diese Annahme wurde durch die Abbildung des BN Western Blots in einem Plotprofil (siehe 7.4.1) bestätigt, das sich aus einer densitometrischen Auswertung der Banden ergibt. Zudem wurde im Plotprofil die I_1IV_1 Bande detektiert. Die SDHA Untereinheit von Komplex II zeigte für beide Zelllinien eine intensive Bande in einem höheren Massenbereich als die von BHM (siehe Abb. 39B). Für die Komplex III Untereinheit UQCRC2 wurden nicht gut aufgelöste Banden im Superkomplexbereich erhalten (siehe Abb. 39C). Etwas oberhalb des Komplex III Dimers (III_2) von BHM wurden definierte Banden für beide Zelllinien detektiert. Zwischen der Superkomplexbande und dem Komplex III Dimer wurden für OLM weitere Banden gefunden, die, dargestellt im Plotprofil, vermuten ließen, dass es sich um III_2IV_x handeln könnte oder um III_4 . Im Plotprofil für den SHM BN Western Blot schien ebenfalls III_2IV_x vorhanden zu sein. Der Nachweis der Komplex IV Untereinheit MTCO1 zeigte ein ähnliches Bild wie für Komplex III: einigermaßen definierte Banden im Bereich der Superkomplexe und des individuellen Komplex IV (IV_1) und der Bereich dazwischen wies lediglich undefinierte Banden bzw. Schmier auf (siehe Abb. 39D). Anhand des Plotprofils für den OLN BN Western Blot wurden jedoch alle Banden gefunden, die auch bei BHM vorhanden waren. Die Bandenverteilung für die ATPB Untereinheit von Komplex V war für beide Zelllinien vergleichbar zu denen von BHM (siehe Abb. 39E). Auffällig war, dass für Komplex V Monomer in BHM die intensivste Bande im Vergleich zu den Komplex V Oligomerbanden gefunden wurde. Im Gegensatz dazu zeigte in SHM das Dimer die intensivste Bande und in OLM schienen Komplex V Monomer und Dimer Banden der gleichen Intensität aufzuweisen. Dies spricht dafür, dass in BHM Komplex V hauptsächlich in seiner monomeren Form vorkommt, wohingegen in SHM das Dimer vorherrscht. In OLM existiert wahrscheinlich ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Komplex V Mono- und Dimer.

Zur Bestätigung, dass die Bandenverteilung von Komplex V Spezies in BHM und den Zellkulturproben tatsächlich vergleichbar ist, wurde ein qualitativer in-Gel CV Hydrolyseaktivitätstest (siehe 4.22.1.2) durchgeführt. Sowohl für OLM als auch für SHM wurden CV Banden auf der gleichen Höhe wie für BHM gefunden (siehe Abb. 39F). Jede Bande zeigte dabei eine CV Hydrolyseaktivität innerhalb der Probe an. Da es sich bei diesem Aktivitätstest um eine Endzeitanalyse handelte, ließ sich jedoch nicht beurteilen, welche Komplex V Spezies aktiver war.

Insgesamt war die Intensität der detektierten Proteinbanden in den BN-Western Blots für OLM und für SHM erheblich geringer als die für BHM. Eine Ausnahme bildete dabei lediglich Komplex II. Eine zu geringe Proteinmenge sollte demnach nicht ursächlich dafür sein. Abschließend lässt sich anhand der BN Western Blots und dem in-Gel CV Hydrolyseaktivitätstest feststellen, dass die Atmungskettenkomplexe I bis IV in Ratten- und humanen Proben eine ähnliche, vom Rind abweichende, native Zusammensetzung aufweisen. Komplex V scheint in allen drei Proben konserviert zu sein.

Für die Zellkulturproben wurden trotz Optimierung des D/P und diverse Änderungen der Blotbedingungen (Dauer und angelegte Spannung) keine so klar definierten Banden wie für BHM im BN Western Blot erzielt, weshalb die Pufferbedingungen bei der Solubilisierung und die Mitochondrienisolierung kritisch betrachtet wurden. Durch eine kurzzeitige Koopera-

tion mit der Arbeitsgruppe von Karin Busch in Osnabrück konnte jedoch gezeigt werden, dass es möglich ist für Zellkulturproben (HeLa Zellen) klar definierte Banden mit guter Intensität im BN Western Blot zu erhalten, wenn die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden zur Anwendung kommen (siehe 7.4.2). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte deshalb nicht geklärt werden, warum die Qualität der BN Western Blots mit Mitochondrienproteinen aus OLN-93 und SH-SY5Y Zellen so schlecht war.

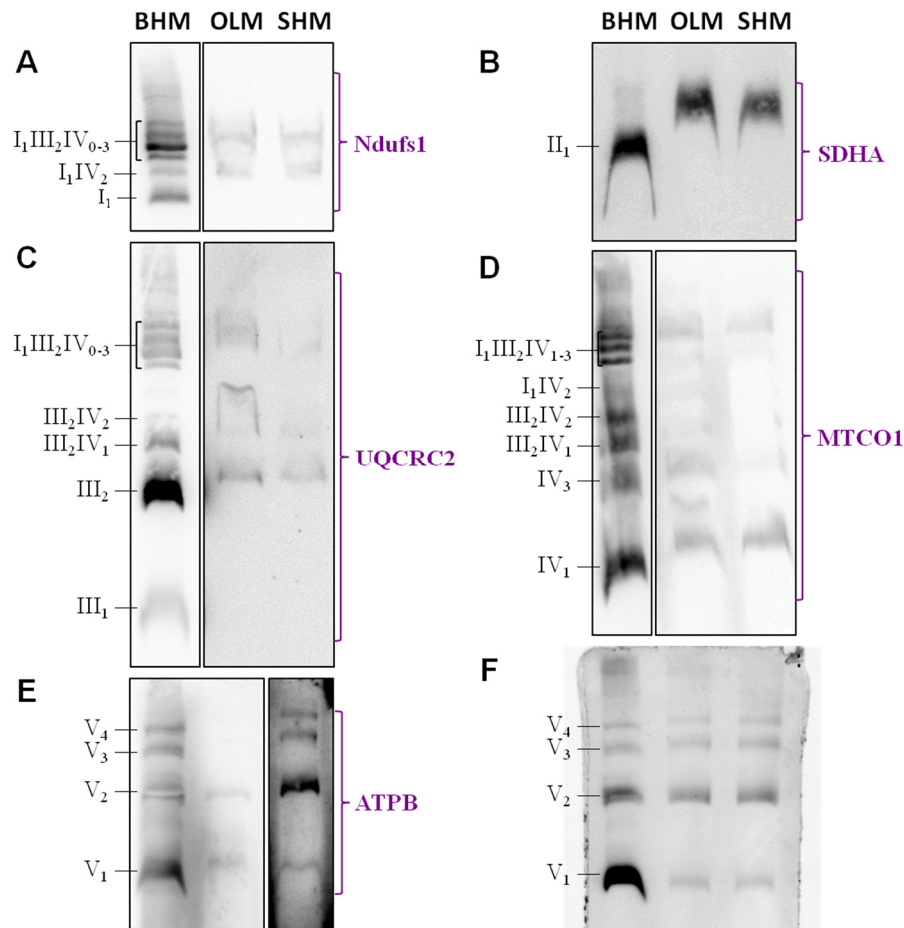


Abb. 39: Identifikation von Atmungskettenproteinen nach Mitochondrienisolation aus Rinderherz (BHM) sowie OLN-93 (OLM) und SH-SY5Y (SHM) Zellen mittels (A-E) BN Western Blot und (F) in-Gel Komplex V Hydrolyseaktivitätstest. Solubilisierte Mitochondrienproteine wurden in einer BN-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und Atmungskettenkomplexe immunochemisch nachgewiesen. Für BHM wurden für alle fünf Atmungskettenkomplexe die erwarteten Banden erhalten. In den Zellkulturproben waren die Proteinbanden im Vergleich zu BHM nach oben verschoben (Ausnahme CV) und teilweise nicht klar definiert (A+C+D). Der in-Gel CV Hydrolyseaktivitätstest bestätigte, dass die Banden aller CV Spezies in Zellkulturproben und BHM auf gleicher Höhe zu finden sind.

Aufgrund der Tatsache, dass die BN Western Blots nur wenige klar definierte Banden ergaben, ließen sich lediglich die Banden für Komplex V auf Coomassie-gefärbten BN-Gelen zuordnen (siehe Abb. 40). Die Komplex II Bande war im BN-Gel nicht erkennbar. Im Vergleich zu BHM zeigten OLM und SHM einen hohen Hintergrund der Coomassiefärbung. Dies ist aufgrund der 4x höheren Proteinkonzentration nicht weiter verwunderlich. Um weitere Proteinbanden im BN-Gel zu identifizieren, eignet sich eine Flüssigchromatographie

gekoppelt mit einer Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), die für einen Teil der Banden am DDZ in Düsseldorf unter Anleitung von Dr. Sonja Hartwig durchgeführt wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in der Dissertation von meiner Kollegin Tamara Dzinic zu finden sein (voraussichtlich 2017). Sie bestätigten die V₁ und V₂ Banden.

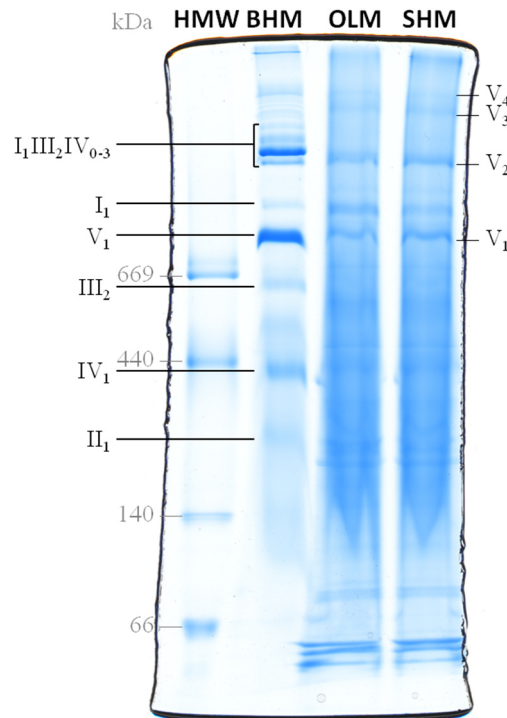


Abb. 40: Native Auftrennung von solubilisierten Mitochondrienproteinen mittels BN-PAGE.
Anhand der BN Western Blots mit OLM und SHM konnten lediglich die CV Banden eindeutig zugeordnet werden.

5.2.3 Proteomanalyse

Quantitative Proteomanalysen dienen der Quantifizierung der Proteinmenge. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Proteom von OLM und SHM in 2D-Gelen quantifiziert, um Auswirkungen des A β Peptids auf die Zellen festzustellen (siehe 5.3.6). Um die erhaltenen Proteinmengen Proteinen zuordnen zu können, mussten die Proteinspots innerhalb der 2D-Gele zunächst identifiziert werden. Die Identifikation einzelner Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen sowie des Hitzeschockproteins Hsp60 und des mitochondrialen Porins VDAC1 wurde immunochemisch über spezifische Antikörper erreicht (siehe 4.23). Je 100 μ g Mitochondrienproteine aus OLN-93 (D/P: 4,0 g/g) und SH-SY5Y (D/P: 6,0 g/g) Zellen wurden mittels 2D-BN/SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.21.3). Anschließend wurden elektrotransferierte Proteine auf einer Nitrozellulosemembran mit spezifischen Antikörpern detektiert (siehe Abb. 41 und 7.5). Die für die BN-PAGE angegebene Proteinmenge bezieht sich dabei immer auf die mittels Bradford-Test (siehe 4.17) bestimmte Proteinmenge nach der Mitochondrienisolation und vor der Solubilisierung.

Für BHM (siehe Abb. 41A) wurden anhand der 2D Western Blots sowie der daraus generierten Plotprofile (siehe 7.5) alle Spots der Atmungskettenkomplexe identifiziert, die

aufgrund der BN Western Blots (siehe Abb. 39) zu erwarten gewesen waren. die Ndufs1 Untereinheit von Komplex I zeigte im Superkomplexbereich einen intensiven Spot, der wahrscheinlich eine Überlagerung mehrerer Superkomplexe ($I_1III_2IV_{0-3}$) darstellt. Selbst im Plotprofil konnte dieser Spot nicht aufgelöst werden. Im Vergleich zu Komplex I innerhalb der Superkomplexe wurde der individuelle Komplex I in einer geringeren Konzentration gefunden. Dieses Ergebnis wurde auch von Hofman et al. [300] erzielt, die CI in humanen mesenchymalen Stammzellen (*human mesenchymal stem cells*, hMSCs) mittels 2D Western Blot mit einem Antikörper gegen die CI Untereinheit ND6 detektierten. Für Untereinheiten von Komplex III (UQCRC2) und IV (MTCO1) wurden die intensivsten Spots im Superkomplexbereich sowie für III_2 bzw. IV_1 erhalten. Komplex V Monomer war die vorherrschende CV Spezies in den 2D Western Blots für BHM (nachgewiesen durch die α - und β -Untereinheiten). Diese Ergebnisse stehen alle im Einklang mit den BN Western Blots für BHM (siehe Abb. 39). Neben Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen konnte Hsp60 nativ aufgetrennt werden. Im 2D Western Blot für BHM wurde das Homoheptamer [301] eindeutig identifiziert. Überraschend war, dass mitochondriales Porin ungefähr auf einer senkrechten Linie mit Komplex V Monomer lokalisiert wurde. Porin, das aus 282 AS aufgebaut ist, bildet durchaus Homooligomere [302] und interagiert mit antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-xL [303], was beides jedoch nicht zu einem so hohen Massenbereich (~750 kDa) bei der nativen Auftrennung in der BN-PAGE führen kann.

Aufgrund der nicht gut aufgelösten Banden in den BN Western Blots für Zellkulturproben wurden für die 2D Western Blots ebenfalls nicht eindeutig voneinander abzugrenzende Spots erwartet. Diese Annahme wurde jedoch nur teilweise bestätigt (siehe Abb. 41B+C). Die Komplex I Untereinheit Ndufs1 wurde sowohl für OLM als auch für SHM ähnlich wie für BHM detektiert. Auch für die Zellkulturproben wurde ein intensiver Spot nachgewiesen, der eine Überlagerung der Superkomplexe $I_1III_2IV_{0-3}$ darstellen dürfte und ein weniger intensiver für den individuellen Komplex I. Für die Komplex II Untereinheit SDHA wurde ein länglicher Spot in beiden Zellkulturproben erhalten. Die Plotprofile (siehe 7.5.2 und 7.5.3) für den Komplex II Nachweis ließen für beiden Zelllinien die Vermutung auf die Existenz von oligomeren Komplex II zu. Dieser konnte bisher nur von Kovarova et al. [304] in einer *clear-native* PAGE nachgewiesen werden. Da im BN Western Blot eindeutig nur der monomere Komplex II detektiert wurde (siehe Abb. 39B), handelte es sich bei den oligomeren Formen im 2D Western Blot wahrscheinlich um Artefakte. Für OLM konnten in den 2D Western Blots mit dem Antikörper gegen die Komplex III Untereinheit UQCRC2 die Superkomplexe nicht einzeln aufgelöst werden (wie auch in den BN Western Blots), wohingegen das Plotprofil für SHM vereinzelte Superkomplexe zeigte. Zusätzlich wurden das Di- und Tetramer von Komplex III sowie III_2IV_x identifiziert. Die intensivsten Spots wurden im Superkomplexbereich und für III_2 in beiden Zelllinien erhalten, was aufgrund der BN Western Blots zu erwarten gewesen war. Für die Komplex IV Untereinheit MTCO1 schienen die vorherrschenden Formen das Mono- und Dimer zu sein (im Blot als eine dicke Bande sichtbar). Darüber hinaus konnten für beide Zelllinien die Superkomplexe ($I_1III_2IV_{1-3}$) nicht einzeln aufgelöst werden. Auch diese Ergebnisse waren aufgrund der BN Western Blots zu erwarten gewesen. Für Komplex V wurde sowohl die α - als auch die β -Untereinheit identifiziert. In

Übereinstimmung mit den BN Western Blots wurde in OLM ein ungefähr gleiches Verhältnis von Mono- und Dimer gefunden. Darüber hinaus zeigte der 2D Western Blot mit dem Antikörper für die α -Untereinheit (ms- α -ATPA) einen Doppelspot sowohl für das CV Monomer als auch für das Dimer. Dieser Doppelspot wird für gewöhnlich nur bei der Verwendung großer Gele beobachtet, weil dann die Laufstrecke länger und somit die Auflösung besser ist. Für SHM konnten unter Verwendung von ms- α -ATPA die Ergebnisse aus den BN Western Blots ebenfalls bestätigt werden. Es wurden Mono-, Di- und Trimer detektiert, wobei das Dimer den intensivsten Spot aufwies. Im Gegensatz dazu zeigte der 2D Western Blot mit ms- α -ATPB für das CV Monomer den intensivsten Spot. Auffällig war, dass für beide Zelllinien hauptsächlich nur das Mono- und Dimer nachgewiesen wurden. Dies lag wahrscheinlich daran, dass für die 2D-Gele ein Teil des BN-Gelstreifens abgeschnitten werden musste und somit der höchst molekulare Bereich verloren ging.

Beide Zelllinien zeigten zudem das Heptamer von Hsp60. Für OLM wurden im 2D Western Blot mit α -Hsp60 noch zusätzliche Spots detektiert, die auf die Aufspaltung des Heptamers in kleinere Oligomere hindeuteten. Wie für BHM wurde mitochondriales Porin in einem molekularen Bereich detektiert, in dem es nicht vermutet wurde. Im Gegensatz zu BHM wurde es jedoch nicht auf einer senkrechten Linie mit Komplex V Monomer gefunden, sondern etwas rechts davon (entspricht ~500-700 kDa im BN-Gel).

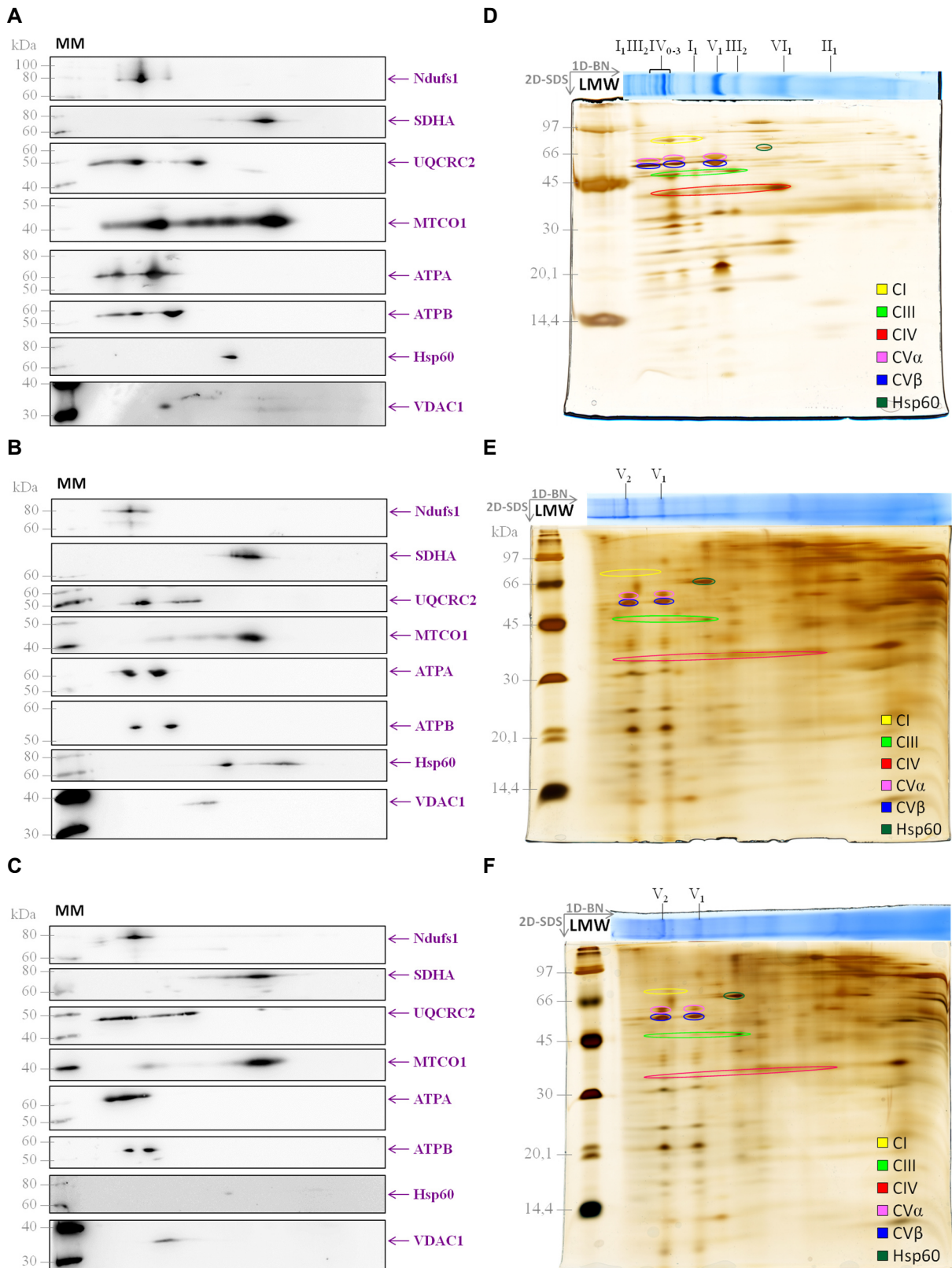
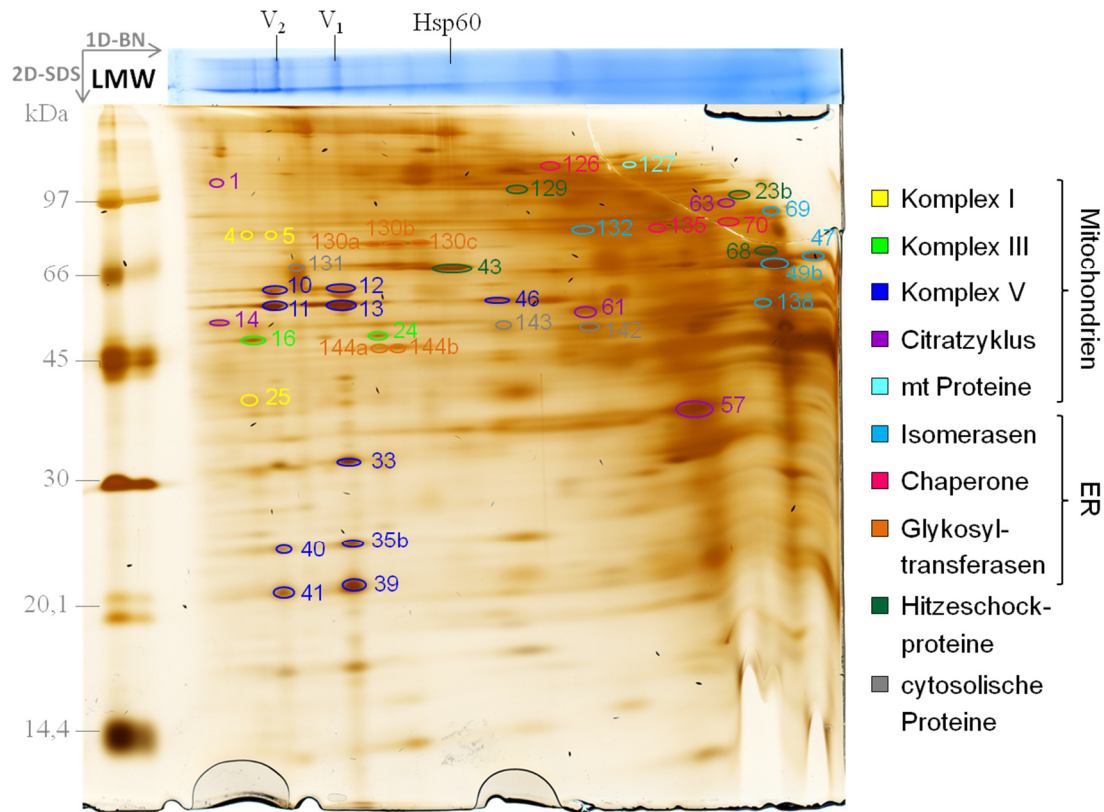


Abb. 41: Identifikation von Mitochondrienproteinen aus (A+D) Rinderherz sowie (B+E) OLN-93 und (C+F) SH-SY5Y Zellen mittels 2D Western Blot. (A-C) 30 µg Proteine aus BHM (D/P: 3,0 g/g) bzw. 100 µg Mitochondrienproteine aus OLN-93 (D/P: 4,0 g/g) oder SH-SY5Y (D/P: 6,0 g/g) Zellen wurden in einer 2D-BN/SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und jeweils mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen (Ndufs1: CI Untereinheit (UE), SDHA: CII UE, UQCRC1: CIII UE, MTCO1: CIV UE, ATPA: CV α-UE,

ATPB: CV β -UE, Hsp60: 60kDa Hitzeschockprotein, VDAC1: mitochondriales Porin). (D-F)
Die charakteristischen Spots der 2D Western Blots wurden Proteinspots auf silbergefärbten 2D-Gelen zugeordnet.

Die Western Blot Analysen gaben erste Aufschlüsse über die Identität und Position mitochondrialer Proteine im 2D-Gel. Allerdings wurde so lediglich eine Untereinheit von Komplex I bis IV bzw. zwei Untereinheiten von Komplex V identifiziert. Um mehrere verschiedene Untereinheiten zu detektieren, hätten weitere Antikörper gegen unterschiedliche Untereinheiten der jeweiligen Atmungskettenkomplexe im 2D Western Blot eingesetzt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine massenspektrometrische Analyse über den Peptidmassenfingerprint (PMF) gewählt, um gleichzeitig nicht nur verschiedene Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen zu identifizieren, sondern auch noch weitere mitochondriale Proteine. Um die bestmögliche Auftrennung einer großen Proteinmenge zu erhalten, wurden 400 μ g Mitochondrienproteine mittels 2D-BN/SDS-PAGE separiert (siehe 4.20.2 und 4.21). Für den PMF wurden die zu identifizierenden Proteinspots aus dem silbergefärbten 2D-Gel (siehe 4.26.2) ausgeschnitten. Nach dem Entfärben der Proteine wurden sie im Gel tryptisch verdaut und dann am MALDI-TOF/TOF MS gemessen (siehe 4.28). Die Peptide wurden anhand der bestimmten absoluten Massen über die Mascot Datenbank identifiziert (Suchparameter siehe Tab. 24). Für die Ratten-Oligodendrozyten-Zelllinie OLN-93 wurde als Taxonomie *Rattus norvegicus* verwendet. Um ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$) für eine MS-Messung zu erzielen, musste der Mascot Score mindestens 52 betragen. Da es sich bei der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y um eine humane Zelllinie handelt, wurde als Taxonomie *Homo sapiens* gewählt. Für ein signifikantes Ergebnis musste ein Mascot Score von 56 erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit sind alle identifizierten Proteine in Tab. 26 aufgeführt. Zur besseren Übersicht wurden die Proteine in unterschiedliche Gruppen eingeteilt: Komplex I, Komplex III, Komplex V, Citratzyklus, sonstige mitochondriale Proteine, Isomerasen, Chaperone, Hitzeschockproteine, Glykosyltransferasen und cytosolische Proteine. Jeder Gruppe wurde eine Farbe zugeordnet und die entsprechenden Proteinspots wurden in den 2D-Gelen für beide Zelllinie markiert (siehe Abb. 42). Die Daten für OLN-93 Zellen wurden in Zusammenarbeit mit meiner Kollegin Lidija Cavlovic gewonnen und wurden deshalb bereits in ihrer Dissertation [298] abgebildet. Da zwischenzeitlich eine in der AG Dencher standardisierte Spotnummerierung für verschiedene Organismen etabliert wurde, wurden den identifizierten Proteinspots für OLN-93 neue Nummern zugeordnet. Somit ist es möglich diese Daten mit denen von SH-SY5Y zu vergleichen.

A OLN-93



B SH-SY5Y

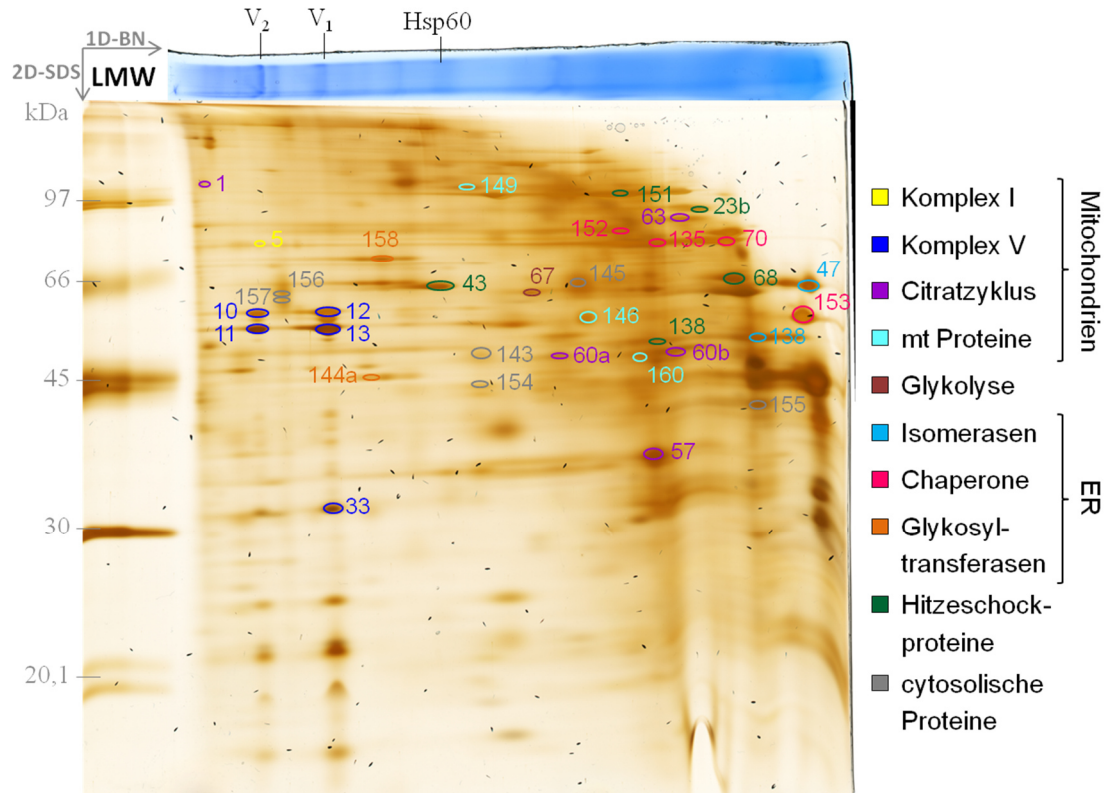


Abb. 42: Mittels PMF identifizierte Proteine aufgetrennt in einer 2D-BN/SDS-PAGE. Anhand der Liste in Tab. 26 können den Spotnummern Proteinennamen zugeordnet werden. (A) Für OLN-93 wurden insgesamt 43 Proteine signifikant identifiziert und (B) für SH-SY5Y 32 Proteine.

Tab. 26: Mittels PMF identifizierte Proteine aufgetrennt in einer 2D-BN/SDS-PAGE. "Nr." entspricht der Spotnummer, die einem Protein im 2D-Gel zugeordnet wurde (siehe Abb. 42); "Proteinname" beschreibt den vollständigen Namen des Proteins, wie er in der UniProt Datenbank eingetragen ist; "Zelllinie" gibt wieder, in welcher Zelllinie der Proteinspot identifiziert wurde; "Abkürzung" steht für die Kurzform des Proteinnamens sowie der Taxonomie, anhand dessen das Protein in der UniProt Datenbank gefunden werden kann; "MW [kDa]" gibt die Molekülmasse in Kilodalton an; "MS-Typ" unterscheidet zwischen MS- und MS/MS-Messung; "Mascot Score" gibt Hinweise auf das Signifikanzniveau; "P." sind die Anzahl gemessener Peptide, "SC [%]" gibt die Übereinstimmung der Peptidsequenz mit der in Mascot hinterlegten Daten in Prozent an.

Nr.	Proteinname	Zelllinie	Abkürzung	MW [kDa]	MS- Typ	Mascot Score	P.	SC [%]
Untereinheiten der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I)								
4	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	OLN-93	NDUS1_RAT	79.4	MS/MS	30.0	1	2.2
5	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	OLN-93	NDUS1_RAT	79.4	MS	116.0	22	37.1
		SH-SY5Y	NDUS1_HUMAN	79.4	MS/MS	49.4	1	2.2
25	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9	OLN-93	NDUA9_RAT	42.5	MS	114.0	19	45.9
					MS/MS	53.6	1	3.4
Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III)								
16	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	OLN-93	QCR2_RAT	48.4	MS	113.0	11	28.1
24	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	OLN-93	QCR2_RAT	48.4	MS	82.5	13	30.8
					MS/MS	48.2	1	3.1
Untereinheiten der F ₁ F ₀ ATP Synthase (Komplex V)								
10	ATP synthase subunit alpha	OLN-93	ATPA_RAT	59.7	MS	175.0	26	52.1
					MS/MS	33.9	1	2.4
		SH-SY5Y	ATPA_HUMAN	59.7	MS	61.5	13	23.5
11	ATP synthase subunit beta	OLN-93	ATPB_RAT	56.3	MS	117.0	21	34.2
					MS/MS	57.9	1	3.6
		SH-SY5Y	ATPB_HUMAN	56.5	MS	213.0	27	48.0
12	ATP synthase subunit alpha	OLN-93	ATPA_RAT	59.7	MS	244.0	31	56.6
					MS/MS	39.4	1	2.4
		SH-SY5Y	ATPA_HUMAN	59.7	MS	148.0	24	36.7
13	ATP synthase subunit beta	OLN-93	ATPB_RAT	56.3	MS/MS	78.3	2	5.2
					MS/MS	43.2	1	2.6
		SH-SY5Y	ATPB_HUMAN	56.5	MS	165.0	25	50.1
33	ATP synthase subunit gamma	OLN-93	ATPG_RAT	30.2	MS/MS	130.3	2	5.3
		SH-SY5Y	ATPG_HUMAN	33.0	MS/MS	52.0	1	5.5
					MS/MS	75.7	1	3.4

Nr.	Proteinname	Zelllinie	Abkürzung	MW [kDa]	MS-Typ	Mascot Score	P.	SC [%]
35b	ATP synthase subunit b	OLN-93	AT5F1_RAT	28.9	MS	58.0	10	30.9
					MS/MS	58.8	1	3.1
39	ATP synthase subunit O	OLN-93	ATPO_RAT	23.4	MS/MS	38.0	1	6.6
40	ATP synthase F(0) complex subunit B1	OLN-93	AT5F1_RAT	28.9	MS	84.4	11	27.3
					MS/MS	96.9	2	7.0
41	ATP synthase subunit O	OLN-93	ATPO_RAT	23.4	MS	65.3	7	34.7
					MS/MS	34.9	1	6.6
46	ATP synthase subunit beta	OLN-93	ATPB_RAT	56.3	MS	136.0	19	47.1
					MS/MS	36.7	1	2.8
Citratzyklus und Glykolyse (Kohlenhydratmetabolismus)								
1	2-oxoglutarate dehydrogenase	OLN-93	ODO1_RAT	116.2	MS	111.0	23	18.3
		SH-SY5Y	ODO1_HUMAN	115.9	MS	59.5	16	17.7
14	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	OLN-93	ODO2_RAT	48.9	MS	81.5	14	25.1
					MS/MS	42.6	1	1.8
57	Malate dehydrogenase	OLN-93	MDHM_RAT	35.7	MS	85.1	9	30.2
					MS/MS	207.2	2	12.1
		SH-SY5Y	MDHM_HUMAN	35.5	MS	61.3	5	21.3
					MS/MS	72.1	2	7.4
60a	Citrate synthase	SH-SY5Y	CISY_HUMAN	51.7	MS/MS	65.4	2	5.6
60b	Citrate synthase	SH-SY5Y	CISY_HUMAN	51.7	MS/MS	78.3	1	3.4
61	Fumarate hydratase	OLN-93	FUMH_RAT	54.4	MS	71.9	12	30.6
					MS/MS	66.1	1	3.6
63	Aconitate hydratase	OLN-93	ACON_RAT	85.4	MS	93.3	20	20.5
					MS/MS	56.0	1	2.1
		SH-SY5Y	ACON_HUMAN	85.4	MS	58.6	10	18.6
67	Pyruvate kinase PKM	SH-SY5Y	KPYM_HUMAN	57.9	MS	65.7	13	26.2
					MS/MS	92.5	1	3.2
Mitochondriale Proteine								
127	Leucine-rich PPR motif-containing protein	OLN-93	LPPRC_RAT	156.6	MS	66.1	22	20.3
146	Serine hydroxymethyltransferase	SH-SY5Y	GLYM_HUMAN	56.0	MS	71.0	16	32.1
149	NAD(P) transhydrogenase	SH-SY5Y	NNTM_HUMAN	113.8	MS/MS	35.6	1	1.2
160	Ornithine aminotransferase	SH-SY5Y	OAT_HUMAN	48.5	MS/MS	118.8	2	7.1
Isomerasen								
47	Protein disulfide-isomerase	OLN-93	PDIA1_RAT	56.9	MS	63.0	13	28.3
					MS/MS	50.8	1	3.7
		SH-SY5Y	PDIA1_HUMAN	57.1	MS	59.0	10	23.6
					MS/MS	60.1	2	6.3
49b	Protein disulfide-isomerase A3	OLN-93	PDIA3_RAT	56.6	MS	306.0	36	67.1
					MS/MS	46.8	1	2.4

Nr.	Proteinname	Zelllinie	Abkürzung	MW [kDa]	MS-Typ	Mascot Score	P.	SC [%]
69	Protein disulfide-isomerase A4	OLN-93	PDIA4_RAT	72.7	MS	147.0	16	31.1
132	Protein disulfide-isomerase A4	OLN-93	PDIA4_RAT	72.7	MS	306.0	39	57.1
					MS/MS	39.1	1	1.7
138	Protein disulfide-isomerase A6	OLN-93	PDIA6_RAT	48.1	MS	71.3	11	30.7
					MS/MS	41.2	1	3.0
		SH-SY5Y	PDIA6_HUMAN	48.1	MS/MS	91.2	2	6.4
Chaperone								
70	78 kDa glucose-regulated protein	OLN-93	GRP78_RAT	72.3	MS	156.0	18	35.9
					MS/MS	43.7	1	2.8
		SH-SY5Y	GRP78_HUMAN	72.3	MS	130.0	12	27.2
					MS/MS	84.5	2	5.5
126	Hypoxia up-regulated protein 1	OLN-93	HYOU1_RAT	111.2	MS	166.0	29	33.6
					MS/MS	46.7	1	1.3
135	78 kDa glucose-regulated protein	OLN-93	GRP78_RAT	72.3	MS/MS	59.0	2	5.4
		SH-SY5Y	GRP78_HUMAN	72.3	MS	116.0	21	38.2
					MS/MS	95.3	2	5.4
152	Calnexin	SH-SY5Y	CALX_HUMAN	67.5	MS/MS	64.6	1	2.7
153	Calreticulin	SH-SY5Y	CALR_HUMAN	48.1	MS/MS	33.8	1	2.6
Hitzeschockproteine								
23b	Heat shock protein HSP 90-beta	OLN-93	HS90B_RAT	83.2	MS	94.0	17	29.3
		SH-SY5Y	HS90B_HUMAN	83.2	MS	77.5	13	22.4
	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	OLN-93	TRAP1_RAT	80.4	MS/MS	37.5	1	2.0
	Heat shock protein HSP 90-alpha	SH-SY5Y	HS90A_HUMAN	84.6	MS	58.1	13	21.2
43	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	OLN-93	CH60_RAT	60.9	MS	128.0	23	45.2
					MS/MS	67.2	1	3.8
		SH-SY5Y	CH60_HUMAN	61.0	MS	106.0	22	34.7
					MS/MS	105.8	2	8.2
68	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	OLN-93	CH60_RAT	60.9	MS	102.0	14	30.0
					MS/MS	56.3	1	3.1
		SH-SY5Y	CH60_HUMAN	61.0	MS	64.6	15	27.4
					MS/MS	70.4	1	3.8
129	Heat shock protein HSP 90-beta	OLN-93	HS90B_RAT	83.2	MS/MS	38.6	1	1.9
151	Endoplasmin	SH-SY5Y	ENPL_HUMAN	92.4	MS/MS	56.1	1	1.1
Glykosyltransferasen								
130a	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	OLN-93	RPN1_RAT	68.3	MS	92.0	10	23.6

Nr.	Proteinname	Zelllinie	Abkürzung	MW [kDa]	MS-Typ	Mascot Score	P.	SC [%]
130b	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	OLN-93	RPN1_RAT	68.3	MS	109.0	19	39.7
					MS/MS	45.9	1	2.5
130c	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	OLN-93	RPN1_RAT	68.3	MS	72.6	15	27.8
					MS/MS	55.5	1	2.0
144a	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	OLN-93	OST48_RAT	48.9	MS/MS	32.6	1	2.0
		SH-SY5Y	OST48_HUMAN	50.8	MS/MS	165.6	3	6.6
144b	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	OLN-93	OST48_RAT	48.9	MS	70.5	11	29.5
					MS/MS	42.6	1	2.5
158	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	SH-SY5Y	STT3A_HUMAN	80.5	MS	57.1	14	17.4
Cytosolische Proteine								
131	T-complex protein 1 subunit alpha	OLN-93	TCPA_RAT	60.3	MS	78.4	14	24.3
142	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	OLN-93	CN37_RAT	47.2	MS	65.7	10	21.9
		OLN-93	ARP3_RAT	47.3	MS	87.8	16	37.8
143	Actin-related protein 3	SH-SY5Y	ARP3_HUMAN	47.3	MS	81.4	13	34.7
					MS/MS	71.7	2	6.7
145	WD repeat-containing protein 1	SH-SY5Y	WDR1_HUMAN	66.2	MS	75.2	13	21.6
					MS/MS	85.4	2	1.8
154	Actin-related protein 2	SH-SY5Y	ARP2_HUMAN	44.7	MS/MS	57.1	1	3.6
155	Annexin A2	SH-SY5Y	ANXA2_HUMAN	38.6	MS/MS	51.5	1	4.1
156	T-complex protein 1 subunit theta	SH-SY5Y	TCPQ_HUMAN	59.6	MS/MS	57.7	1	1.8
157	T-complex protein 1 subunit beta	SH-SY5Y	TCPB_HUMAN	57.5	MS	70.6	14	35.9

In OLN-93 Proben wurden insgesamt drei Proteinspots identifiziert, die zur NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) gehören. Es wurden die beiden Untereinheiten NDUS1 (Nr. 4 und 5) und NDUFA9 (Nr. 25) gefunden. Die Untereinheit NDUS1 wurde auch im 2D Western Blot (siehe Abb. 41, rb- α -Ndufs1 Antikörper) detektiert und stimmte mit den Proteinspots 4 und 5 überein. Die Lage der beiden Proteinspots im Gel ließ darauf schließen, dass es sich dabei um Komponenten der Superkomplexe I₁III₂IV₀₋₃ handelte, wahrscheinlich um I₁III₂ und I₁III₂IV₂. In BN-Gelen, in denen solubilisierte Rattenherzmitochondrien elektrophoretisch aufgetrennt wurden, wurde diese Untereinheit bereits innerhalb der Superkomplexe I₁III₂IV₀₋₃ mittels LC-MALDI-MS/MS nachgewiesen. Gleiches gilt für die Untereinheit NDUFA9 [305].

In SH-SY5Y Proben wurde lediglich die NDUS1 Untereinheit detektiert (Nr. 5). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von OLN-93 handelt es dabei sehr wahrscheinlich um einen Teil des Superkomplexes I₁III₂.

In Säugetieren setzt sich Komplex I aus insgesamt 45 Untereinheiten zusammen und bildet mit ca. 1 MDa den größten Atmungskettenkomplex [140, 276]. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Untereinheit NDUS1 ist eine der 14 konservierten Untereinheiten, die für eine vollständige Funktion des Komplexes benötigt werden. Sie ist Teil des Eisen-Schwefel-Zentrums, das die NADH Dehydrogenase Aktivität aufweist [140, 306]. Bei NDUA9 handelt es sich um eine nicht katalytische CI Untereinheit, die in der hydrophoben Transmembrandomäne des Komplexes lokalisiert ist [307]. Von den sieben mitochondrial codierten Untereinheiten (ND1-6 und ND4L) konnte im Rahmen dieser Arbeit keine identifiziert werden.

Untereinheiten für die Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) wurden lediglich für OLN-93 identifiziert. Bei beiden Proteinspots handelte es sich um die QCR2 Untereinheit (Nr. 16 und 24), die sich deshalb auf einer horizontalen Linie befanden. Proteinspot 16 lag zudem auf einer vertikalen Linie mit den CI Untereinheiten NDUS1 (Nr. 4) und NDUA9 (Nr. 25). Die QCR2 Untereinheit wurde ebenfalls im 2D Western Blot detektiert (siehe Abb. 41, a-UQCRC2 Antikörper). Anhand der bisherigen Erkenntnisse aus 2D Western Blots sollte es sich bei den Proteinspots um Untereinheiten der Superkomplexe I₁III₂IV₂ und III₂IV_x handeln. Wie für die Komplex I Untereinheiten wurde auch die QCR2 Untereinheit von Komplex III u.a. in den Superkomplexen I₁III₂IV₂ und III₂IV_x nachgewiesen [305].

Komplex III besteht aus elf Untereinheiten (~240 kDa), wobei das Homodimer die katalytische Funktion übernimmt. Evolutionär konserviert sind das in der Transmembranhelixregion lokalisierte Cytochrom b (Untereinheit CYB), das mitochondrial codiert ist und die in der Intermembranraumregion lokalisierten Cytochrom c₁ (Untereinheit IV) und Rieske Eisen-Schwefel-Zentren (Untereinheit V) [140]. Bei der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Untereinheit QCR2 handelt es sich um das Core Protein II, das am Zusammenbau des Komplexes beteiligt ist [308]. Die mitochondrial codierte CIII Untereinheit CYB wurde nicht identifiziert.

In OLN-93 Proben wurden zehn Proteinspots für die F₁F₀ ATP Synthase (Komplex V) identifiziert, die sechs verschiedenen Untereinheiten zugeordnet werden konnten. Es wurden die Untereinheiten α (ATPA, Nr. 10 und 12), β (ATPB, Nr. 11, 13 und 46), γ (ATPG, Nr. 33), b/B1 (AT5F1, 35b, 40) und O (ATPO, Nr. 39 und 41) detektiert. Bei Proteinspot 46 dürfte es sich um den F₁ Teil von Komplex V handeln (freier F₁ Teil). In SH-SY5Y Proben wurden die Untereinheiten α (Nr. 10 und 12), β (Nr. 11 und 13) und γ (Nr. 33) identifiziert.

Für jeden Assemblierungszustand waren identische Untereinheiten wie erwartet auf einer horizontalen Linie positioniert. Unterschiedliche Untereinheiten innerhalb eines Assemblierungszustandes lagen auf zwei vertikalen Linien, wie es bereits für die α- und β-Untereinheit im 2D Western Blot beobachtet wurde (siehe Abb. 41, a-ATPA und a-ATPB Antikörper). Die Untereinheiten entlang der vertikalen Linie waren alle Bestandteil von Komplex V Monomer (Nr. 12, 13, 33, 35b, 39) bzw. Dimer (Nr. 10, 11, 40, 41). Allerdings wurden durch LC-MS/MS Analysen im BN-Gel mehr Untereinheiten von Komplex V Mono- und Dimer erhalten als in der vorliegenden Arbeit durch PMF von Proteinspots innerhalb von 2D-Gelen

(Daten werden in der Dissertation von Tamara Dzinic zu finden sein, voraussichtlich 2017). Im Vergleich zu den Ergebnissen der 2D-Gele wurden in OLN-93 Proben für Komplex V Monomer sechs weitere Untereinheiten durch LC-MS/MS identifiziert und für CV Dimer sieben. Auffällig war, dass die Untereinheit ATPG von Komplex V Monomer in 2D-Gele mit SH-SY5Y über PMF detektiert wurde, im BN-Gel über LC-MS/MS jedoch nicht. Außerdem wurden im Vergleich zu den PMF-Ergebnissen der Proteinspots aus 2D-Gele vier weitere Untereinheiten im BN-Gel über LC-MS/MS identifiziert. Im BN-Gel mit SH-SY5Y wurden zudem drei weitere Untereinheiten für das CV Dimer gefunden.

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs der insgesamt 16 verschiedenen Untereinheiten von Komplex V identifiziert. Komplex V ist aus zwei Domänen aufgebaut: der hydrophile F_1 Teil ragt in die mitochondriale Matrix und besitzt die katalytische Synthaseaktivität, wohingegen der in die Membran eingebettete F_0 Teil an der Protonentranslokation beteiligt ist. Beide Domänen sind sowohl über einen zentralen als auch peripheren Stiel miteinander verbunden. F_1 ist aus den Untereinheiten α , β , γ , δ und ϵ im Verhältnis von 3:3:1:1:1 aufgebaut. Die α - und β -Untereinheiten sind alternierend zu einem hexameren Ring angeordnet. Beide vermögen Nukleotide zu binden, aber nur die β -Untereinheiten sind an der Katalyse beteiligt. Die γ -Untereinheit ragt als Teil des zentralen Stiels in den hexameren Ring aus α - und β -Untereinheiten. Ein Rotationsmechanismus des zentralen Stiels (γ , δ , ϵ) koppelt die ATP Synthese der katalytischen F_1 Domäne mit der Protonentranslokation. F_0 besteht aus einem c-Ring, der 10 bis 14 c-Untereinheiten enthält, sowie einer mitochondrial codierten a-Untereinheit an der Außenseite des c-Ringes. Der periphere Stiel setzt sich aus den Untereinheiten b, d, F_6 und O zusammen. Er dient als Stator. Komplex V weist noch vier weitere nicht gut charakterisierte Untereinheiten innerhalb der Transmembrandomäne auf, von denen eine mitochondrial codiert ist [140]. In der vorliegenden Arbeit wurden für beide Zelllinien mit α , β und γ Untereinheiten der katalytischen F_1 Domäne identifiziert. Darüber hinaus konnten für OLN-93 Untereinheiten des peripheren Stiels (Untereinheiten b/B1 und O) nachgewiesen werden. Mitochondrial codierte Untereinheiten wurden nicht identifiziert.

Neben den Atmungskettenkomplexen wurden weitere mitochondriale Proteine identifiziert. Es wurden sechs verschiedene Proteine, die mit dem Citratzyklus assoziiert sind, detektiert. Im Citratzyklus werden durch Oxidation von Acetyl-CoA, das aus dem Abbau von Kohlenhydraten stammt, Guanosintriphosphat (GTP) sowie die beiden Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 gewonnen. Die Citrat-Synthase (CISY, identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 60a/b) katalysiert als erstes Enzym des Zyklus die Kondensation von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat. Citrat wird durch die Aconitase (ACON, identifiziert für beide Zelllinien, Nr. 63) zu Isocitrat isomerisiert, das wiederum durch die Isocitrat-Dehydrogenase oxidativ decarboxyliert wird, wobei NAD^+ reduziert wird. Das entstandene α -Ketoglutarat wird durch den α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex in Anwesenheit von NAD^+ und Coenzym A zu Succinyl-CoA oxidativ decarboxyliert. Der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex ist ein Multienzymkomplex bestehend aus den drei Komponenten α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (ODO1, identifiziert für beide Zelllinien, Nr. 1), der Transsuccinylase (ODO2, identifiziert für OLN-93, Nr. 14) und der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase. GTP wird im nächsten Schritt des Citratzyklus durch die Spaltung des Thioesters im Succinyl-CoA

gebildet. Durch die von der Succinyl-CoA-Synthetase (auch Succinat-Thiokinase genannt) entsteht Succinat, das wiederum durch die Succinat-Dehydrogenase zu Fumarat oxidiert wird, wobei FADH_2 gebildet wird. Im nächsten Schritt katalysiert die Fumarase (FUMH, identifiziert für OLN-93, Nr. 61) die Hydratisierung von Fumarat zu L-Malat. Abschließend wird Oxalacetat regeneriert, indem L-Malat durch die Malat-Dehydrogenase (MDHM, identifiziert für beide Zelllinien, Nr. 57) oxidiert wird. In diesem letzten Schritt des Citratzyklus wird ein weiteres Molekül $\text{NADH} + \text{H}^+$ gebildet [309].

CISY kommt normalerweise als Homodimer vor [310]. Für SH-SY5Y Proben wurde es 2x (Nr. 60a/b) an Stellen detektiert, die aufgrund der Molmasse nicht erwartet wurden. Demzufolge schien CISY mit weiteren Proteinen zu interagieren oder höhere Homooligomere auszubilden. In BHM wurde es als Dimer gefunden [311]. Gleiches galt für ACON (Nr. 63), das normalerweise als Monomer existiert [312]. Da die Position der Proteinspots im 2D-Gel der bei BHM entsprach [311], schien es sich hierbei um keine zufällige Interaktion zu handeln. Die beiden identifizierten Komponenten des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (Nr. 1 und 14) lagen wie bei BHM [311] auf einer vertikalen Linie, wodurch sie sich gegenseitig verifizierten. Auffällig war der hohe molekulare Bereich (ca. 2 MDa), in dem sie detektiert wurden (nach der nativen Auftrennung). Obwohl die molekulare Masse dieses Multienzymkomplexes nicht herausgefunden werden konnte, erschien die Lage der Proteinspots durchaus realistisch, weil sich der Multienzymkomplex aus einer Vielzahl an Kopien der drei Komponenten ODO1, ODO2 und Dihydrolipoyl-Dehydrogenase zusammensetzt [313]. FUMH (Nr. 61) existiert als Homotetramer [314]. Es wurde für OLN-93 ungefähr an gleicher Stelle gefunden wie für BHM [311]. MDHM (Nr. 57) kommt als Homodimer vor [315]. In der vorliegenden Arbeit wie auch bei BHM [311] schien es mit weiteren Proteinen assoziiert zu sein oder höhere Homooligomere auszubilden.

Das mitochondriale Hitzeschockprotein Hsp60 gehört zur Chaperonin-Familie. Es vermittelt vermutlich die korrekte Faltung von Proteinen, die in die Mitochondrienmatrix importiert wurden. Darüber hinaus scheint es Missfaltungen verhindern zu können sowie die erneute Faltung und den korrekten Zusammenbau von ungefalteten Polypeptiden unter Stressbedingungen zu fördern [316]. Hsp60 ist ein Homooligomer aus 14 identischen Untereinheiten, die sich zu zwei ringförmigen Heptameren zusammenlagern [301]. In der vorliegenden Arbeit wurde Hsp60 (CH60) für beide Zelllinien sowohl als Homoheptamer (Nr. 43) als auch als Monomer (Nr. 68) identifiziert.

In OLN-93 Proben wurde das *Leucine-rich PPR motif-containing protein* (LPPRC, Nr. 127) identifiziert. Es spielt wahrscheinlich eine Rolle im mitochondrialen RNA Metabolismus. Zudem ist es u.a. an der Translation oder der Stabilisierung der mitochondrial codierten Komplex IV Untereinheiten (COX1-3) beteiligt. LPPRC kommt als Monomer vor, interagiert aber mit einigen anderen Proteinen [317], was die leicht höhere Molekularmasse nach der BN-PAGE erklären würde.

Die Serinhydroxymethyltransferase (GLYM, identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 146) katalysiert die gleichzeitige, reversible Umwandlung von 5,10-Methylenetetrahydrofolat zu Tetrahydrofolat und die von Glycin zu L-Serine. Dadurch trägt es zum mitochondrialen Thymidylat-Biosyntheseweg bei, der benötigt wird um Uracileinlagerungen in die mtDNA zu verhindern.

GLYM kommt als Homotetramer vor, wenn es Pyridoxal-5'-Phosphat gebunden hat und in Abwesenheit von Pyridoxal-5'-Phosphat als Homodimer [318]. In der vorliegenden Arbeit wurde es als Homotetramer identifiziert.

Die NAD(P) Transhydrogenase (NNTM, identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 149) vermittelt die Transhydrogenierung zwischen $\text{NADH} + \text{H}^+$ und NADP^+ . Das Homodimer dient als Protonenpumpe über die Membran [319]. In der vorliegenden Arbeit schien NNTM noch mit weiteren Proteinen assoziiert zu sein, denn im BN-Gel wurde es nicht bei den erwarteten 228 kDa gefunden, sondern in einem höheren Massenbereich. Bei BHM wurde an der gleichen Position NNTM identifiziert [311]. Die mutmaßlichen Interaktionen dürften somit nicht zufällig zustande gekommen sein.

Die Ornithinminotransferase (OAT, identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 160) spielt eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen L-Prolin-Biosynthese aus Ornithin, indem es die reversible Bildung des ersten Intermediats katalysiert. OAT kommt als Homohexamer vor [320], detektiert wurde es eher als Homotetramer.

Neben mitochondrialen Proteinen wurden ebenfalls einige Proteine des Endoplasmatischen Reticulums (ER) identifiziert. Dies war aufgrund der verwendeten Methode zur Mitochondrienisolation zu erwarten. Die Mitochondrienfraktion wurde durch differenzielle Zentrifugation anhand der Sedimentationsgeschwindigkeiten der einzelnen Organellen erhalten und war daher mit anderen Organellen "verunreinigt".

In OLN-93 Proben wurden vier verschiedene Proteindisulfidisomerasen (PDIA1: Nr. 47, PDIA3: Nr. 49b, PDIA4: Nr. 69, 132 und PDIA6: Nr. 138) gefunden, in SH-SY5Y Proben PDIA1 und PDIA6. PDIA1 ist ein multifunktionales ER Protein, welches die Bildung, das Aufbrechen sowie die Neuordnung von Disulfidbrücken katalysiert [321]. Im Gegensatz dazu vermitteln PDIA3, PDIA4 und PDIA6 lediglich die Neuordnung von Disulfidbrücken [322-324]. PDIA1 kommt hauptsächlich als Hetero- oder Homodimer vor [321], wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch als Monomer detektiert. PDIA3 ist eigentlich eine Untereinheit des TAP (*transporter associated with protein processing*) Komplexes [322], wurde hier aber ebenfalls als Monomer identifiziert. PDIA4 und PDIA6 sind Teil des selben Chaperonmulti-proteinkomplexes [323, 324]. Besonders Proteinspot 132 dürfte noch mit weiteren Chaperonen assoziiert sein, weil er im BN-Gel bei schätzungsweise 250 kDa identifiziert wurde und das Monomer lediglich 72,7 kDa aufweist.

Endoplasmin (ENPL, identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 151) oder auch Hitzeschockprotein Hsp90B1 ist an der Sekretierung und dem Transport sekretierter Proteine im ER beteiligt. Es wurde wie erwartet in seiner homodimeren Form gefunden [325].

Das 78 kDa *glucose-regulated protein* (GRP78, identifiziert für beide Zelllinien, Nr. 70, 135) spielt eine Rolle beim Zusammenbau multimerer Proteinkomplexe im ER und ist an der korrekten Proteinfaltung sowie der Degradation missgefalteter Proteine beteiligt. Die Fähigkeit von GRP78 mit dem Chaperon DNAJC1 zu interagieren, würde erklären, warum dieses Protein nach der nativen Auftrennung eine leicht erhöhte Molekularmasse aufwies (Nr. 70). Außerdem wurde es als Teil eines großen Multichaperonkomplexes identifiziert (Nr. 135) [326].

Hypoxia up-regulated protein 1 (HYOU1, identifiziert für OLN-93, Nr. 126) spielt eine cytoprotektive Rolle bei Hypoxie-induziertem zellulärem Stress. Außerdem ist es als Chaperon an der Proteinfaltung im ER beteiligt. HYOU1 ist Teil eines großen Chaperonmultiproteinkomplexes, was erklärt, warum dieses Protein nach nativer Auftrennung schätzungsweise bei 200 bis 300 kDa lokalisiert war [327].

Calnexin (CALX, identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 152) ist ein Calciumbindeprotein, das eine wichtige Rolle im Qualitätskontrollapparat des ER einnimmt. Die von den Erwartungen abweichende Lage des Proteinspots im 2D-Gel erklärt sich dadurch, dass CALX mit diversen Proteinen (u.a. Ribosomen) interagiert [328]. Ein weiteres Calciumbindeprotein wurde mit Calreticulin (CALR, identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 153) identifiziert. Das Chaperon fördert die Faltung, die Oligomerisierung und Qualitätskontrolle im ER. In der vorliegenden Arbeit wurde es wie erwartet als Monomer detektiert [329].

Mit RPN1 und OST48 (OLN-93) bzw. OST48 und STT3A (SH-SY5Y) wurden insgesamt drei verschiedene Untereinheiten des N-Oligosaccharyltransferase(OST)-Komplexes identifiziert. Der Komplex transferiert Mannoseoligosaccharide von Dolichol zu einem Asparaginrest innerhalb des Konsensusmotivs Asn-X-Ser in Proteinen. Das Transmembranprotein, das im ER lokalisiert ist, setzt sich aus mindestens sieben Untereinheiten zusammen: RPN1, RPN2, OST48, DAD1, OSTC, KRTCAP2 und entweder STT3A oder STT3B. RPN1 (identifiziert für OLN-93, Nr. 130a-c) und OST48 (identifiziert für beide Zelllinien, Nr. 144a/b) gehören zu den essentiellen Untereinheiten [330, 331]. STT3A (identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 158) besitzt die katalytische Aktivität und vermittelt die cotranslationale Glykosylierung von Polypeptidketten [332]. Die Untereinheit RPN1 wurde in OLN-93 Proben 3x auf einer horizontalen Linie in unmittelbarer Nähe gefunden. Dies ließ darauf schließen, dass der OST-Komplex (130c) weitere Interaktionen einging. Tatsächlich bildet er stabile Komplexe mit dem Sec61 Komplex (wahrscheinlich Nr. 130b) sowie dem Sec61 und TRAP Komplex (wahrscheinlich Nr. 130a) aus. Die beiden identifizierten OST48 Untereinheiten befanden sich auf zwei parallel verlaufenden vertikalen Linien mit RPN1. RPN1 und OST48 wurden somit eindeutig als Untereinheiten desselben Komplexes zugeordnet. Auffällig war, dass STT3A (Nr. 158) für SH-SY5Y dort detektiert wurde, wo bei OLN-93 RPN1 (Nr. 130b) zu finden war, weil sich beide Untereinheiten eindeutig in ihrer Masse (RPN1: 68,3 kDa, STT3A: 80,5 kDa) unterscheiden.

Proteinspot 23b konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig identifiziert werden. Für OLN-93 wurde HS90B sowie TRAP1 und für SH-SY5Y wurde HS90B sowie HS90A detektiert. Da es sich bei diesen drei Proteinen um Isoformen handelt, die hohe Sequenzhomologien aufweisen, war dies nicht weiter verwunderlich. An dieser Stelle kann allerdings nicht mit Sicherheit gesagt werden, um welches der drei Proteine es sich handelt. HS90A kommt im Cytosol vor, HS90B im ER und TRAP1 in Mitochondrien [333]. HS90A und HS90B sind Chaperone, die das Reifen, die Strukturaufrechterhaltung und die Regulation spezifischer Zielproteine vermitteln [334, 335]. Im Gegensatz dazu ist TRAP1 an der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion beteiligt, wahrscheinlich durch die Stabilisierung von Komplex I [336]. Alle drei Proteine wurden in ihrer monomeren Form identifiziert, wobei HS90A und HS90B normalerweise als Homodimere vorkommen [334, 335]. HS90B interagiert zusätzlich

mit diversen anderen Proteinen, was erklären würde, warum es als Proteinspot 132 nach der BN-PAGE eine Molekularmasse von ungefähr 200 kDa aufwies.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch cytosolische Proteine identifiziert:

Neben den Enzymen des Citratzyklus wurde ein weiteres Protein, das am Glucosestoffwechsel beteiligt ist, identifiziert. Die Pyruvatkinase (KPYM, identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 67) katalysiert den Transfer der Phosphorylgruppe des Phosphoenolpyruvats zu ADP, wodurch als Endprodukt der Glykolyse Pyruvat entsteht. Pyruvat wird anschließend vom Cytosol in die Mitochondrien transportiert, wo es nach Umwandlung in Acetyl-CoA dem Citratzyklus zur Verfügung steht [309]. KPYM existiert als Homotetramer, wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings als Bestandteil des sogenannten Glykolytischen Enzymkomplexes (enthält mehrere Enzyme, die an der Glykolyse beteiligt sind) gefunden [337].

Vom *T-complex protein 1* (TCP1) wurden insgesamt drei Untereinheiten identifiziert: TCPA (identifiziert für OLN-93, Nr. 131), TCPQ (identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 156) und TCPB (identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 157). Das cytosolische Chaperon assistiert bei der Proteinfaltung unter ATP-Hydrolyse. Es bildet einen heterooligomeren Komplex mit zwei gestapelten Ringen aus, der 850 bis 900 kDa groß ist. In der vorliegenden Arbeit wurden die TCP1 Untereinheiten (alle auf einer vertikalen Linie gelegen) als Komponenten des BBS/CCT Komplexes gefunden [338-340].

Die Hydrolase CN37 (identifiziert für OLN-93, Nr. 142) ist ein Myelin-assoziiertes Enzym des RNA Metabolismus, das ausschließlich in Oligodendrozyten exprimiert wird [341, 342]. Es existiert als Mono- und Dimer [343], wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings als höheres Oligomer oder in Assoziation mit weiteren Proteinen gefunden.

Bei dem Arp2/3 Komplex handelt es sich um einen Proteinkomplex mit sieben Untereinheiten, der in der Regulation der Aktinpolymerisierung involviert ist. Mit ARP2 (identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 154) und ARP3 (identifiziert für beide Zelllinien, Nr. 143) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die ATP-Bindungskomponenten innerhalb des Arp2/3 Komplexes identifiziert [344, 345].

Das *WD repeat-containing protein 1* (WDR1, identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 145) induziert in Zusammenarbeit mit anderen Proteinen den Abbau von Aktinfilamenten [346]. Es wurde assoziiert mit anderen Proteinen gefunden.

Annexin A2 (ANXA2, identifiziert für SH-SY5Y, Nr. 155) ist ein Calcium-abhängiges Phospholipidbindeprotein, das wahrscheinlich in der Hitzeschockantwort involviert ist. Es ist aus zwei leichten und zwei schweren Ketten (Heterotetramer) aufgebaut, wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings als Dimer (wahrscheinlich aus zwei schweren Ketten) gefunden [347].

Insgesamt wurden mittels PMF 41 Proteine für OLN-93 signifikant identifiziert (siehe Abb. 43A): davon waren 28 (52%) in den Mitochondrien lokalisiert, 17 (31%) im ER und neun (17%) im Cytosol. Für SH-SY5Y wurden 32 Proteine signifikant identifiziert. In den Mitochondrien befanden sich 16 (50%) Proteine, im ER neun (28%) und im Cytosol sieben (22%). 18 Proteine wurden sowohl für OLN-93 als auch für SH-SY5Y identifiziert (siehe Abb. 43B). Von diesen 18 identischen Proteinen waren elf (61%) in den Mitochondrien lokalisiert.

Scheffler et al. [348] analysierten ebenfalls das mitochondriale Proteom von SH-SY5Y Zellen. Sie identifizierten 61 Proteine, von denen acht identisch zu Proteinen waren, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für SH-SY5Y Zellen detektiert wurden. Da die Mitochondrienfraktion von Scheffler et al. mittels 2D-IEF/SDS-PAGE aufgetrennt wurde, lässt sich an dieser Stelle das Proteinspotmuster nicht vergleichen. Die Wahl einer anderen Auftrennmethode in der ersten Dimension erklärt jedoch, warum lediglich acht identische Proteine gefunden werden konnten. Bei der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) handelt es sich zwar um eine effiziente Methode zur Proteinauftrennung, sie weist aber auch eine Reihe von Limitierungen auf. So können z.B. hydrophobe Membranproteine sowie Proteine, die einen besonders hohen bzw. niedrigen isoelektrischen Punkt (pI) oder eine sehr hohe bzw. niedrige Molekularmasse aufweisen, so gut wie nicht aufgetrennt werden. Im Gegensatz dazu können in einer BN-PAGE hydrophobe Proteine effizient separiert werden und Protein-Protein-Interaktionen bleiben erhalten, dafür ist die Auflösung jedoch relativ gering [349-353]. Es scheint als könnten mit den beiden Methoden sich ergänzende Informationen über das mitochondriale Proteom erhalten werden.

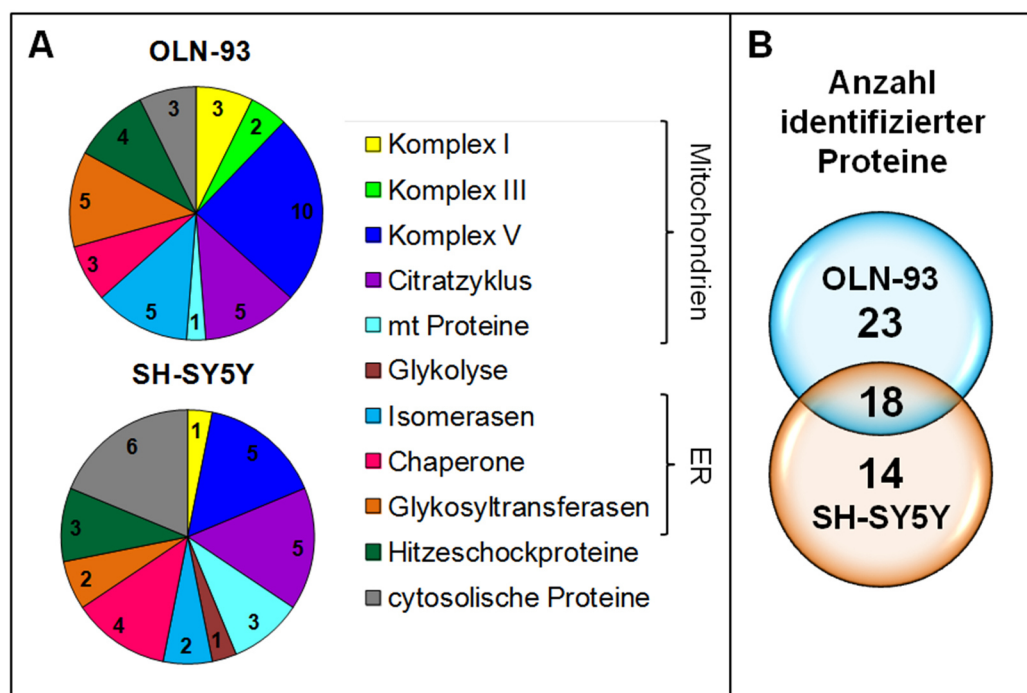


Abb. 43: Verteilung der mittels PMF identifizierten Proteine aufgetrennt in einer 2D-BN/SDS-PAGE. (A) Anzahl der Proteine, die für die verschiedenen Gruppen identifiziert wurden. (B) Für OLN-93 wurden insgesamt 41 Proteine identifiziert, für SH-SY5Y 32. Es wurden für beide Zelllinien 18 identische Proteine detektiert.

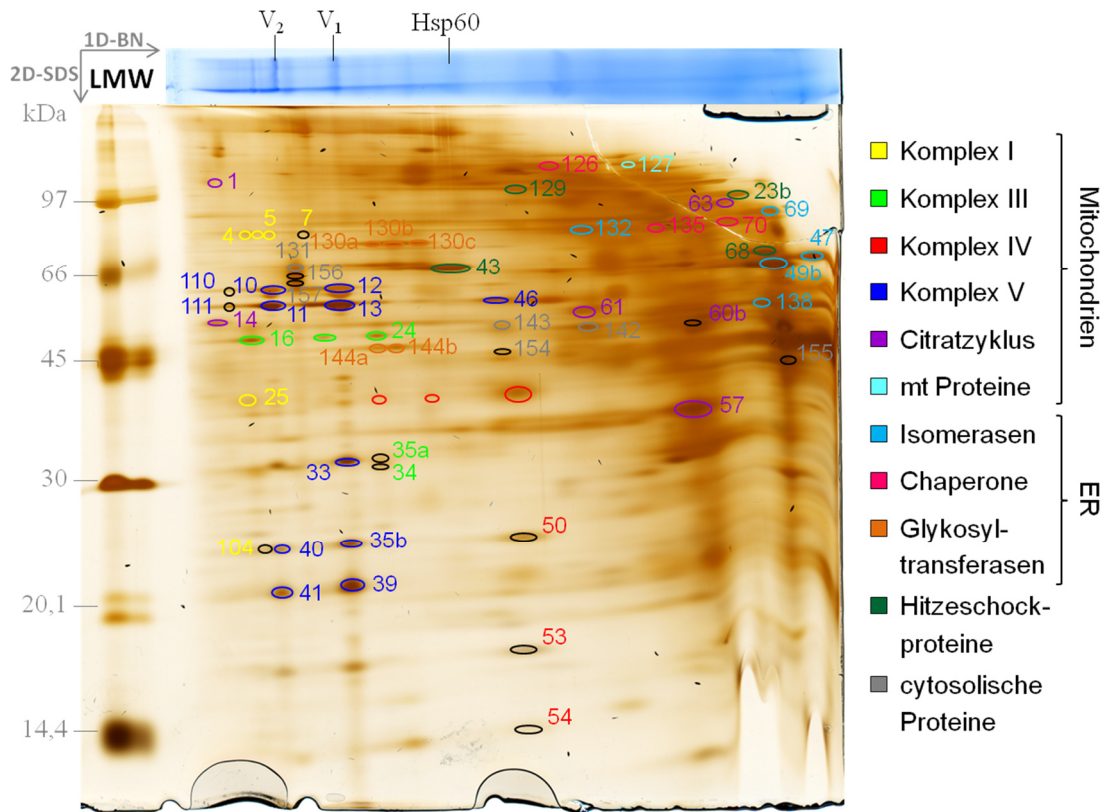
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten mittels PMF keine Proteinspots für die beiden OxPhos Komplexe II und IV innerhalb von 2D-Gelen identifiziert werden. Jeweils eine Untereinheit dieser Komplexe wurde allerdings im Western Blot detektiert. Für CII konnte jedoch die exakte Lokalisation des Proteinspots auf dem 2D-Gel nicht definiert werden. Die mitochondrial codierte MTCO1 Untereinheit von Komplex IV (auch COX1 genannt) konnte hingegen für beide Zelllinien in den 2D-Gelen identifiziert werden. Für OLN-93 fanden sich

Proteinspots für das Mono- sowie Dimer und für den Superkomplex III_2IV_1 , für SH-SY5Y konnte ausschließlich der Proteinspot für den individuellen Komplex IV eindeutig lokalisiert werden (siehe Abb. 44, rot umrandete Proteinspots ohne Spotnummer). Darüber hinaus wurden für die CI Untereinheit NDUS1 weitere Proteinspots identifiziert. Sie ließen sich dem individuellen Komplex I und dem Superkomplexbereich $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}_{0-3}$ zuordnen (siehe Abb. 44, gelb umrandete Proteinspots ohne Spotnummer).

Da viele Proteine in den meisten Säugetieren weitestgehend homolog sind, wurde das Spotmuster in 2D-Gelen von OLN-93 mit dem von SH-SY5Y verglichen, um weitere Proteine zu identifizieren. Darüber hinaus wurden die Daten vom AG Dencher internen Standard BHM herangezogen (siehe Abb. 44, schwarz umrandete Proteinspots mit farbiger Spotnummer und Tab. 27). Der Vergleich mit BHM identifizierte eindeutig den individuellen Komplex I über die NDUS1 Untereinheit (Nr. 7), die bereits für den Superkomplexbereich $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}_{0-3}$ (Nr. 4 und 5) im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurde. Darüber hinaus wurde mit NDUV2 (Nr. 104) eine weitere CI Untereinheit im Superkomplexbereich $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}_{0-3}$ identifiziert. Wie NDUS1 ist NDUV2 eine Komponente des Eisen-Schwefel-Zentrums, das die NADH-Dehydrogenase Aktivität aufweist [354]. Für die Komplex III Untereinheit QCR2 wurde durch den Vergleich mit BHM ein weiterer Proteinspot (Nr. 22) identifiziert, der sich sehr wahrscheinlich Superkomplex III_2IV_2 zuordnen lässt. Darüber hinaus wurden mit Cytochrom c_1 (CY1, Nr. 34) und Cytochrom b (CYB, mitochondrial codiert, Nr. 35a) zwei der drei evolutionär konservierten Proteine erhalten [140]. Da sie auf einer vertikalen Linie mit Proteinspot Nr. 24 lagen und sich auf dieser Linie ebenfalls die COX1 Untereinheit befand, waren die beiden Untereinheiten als Teil des Superkomplexes III_2IV_1 anzusehen. Mit den Untereinheiten 2 (COX2, Nr. 50), 4 (COX4, Nr. 53) und 5A (COX5A, Nr. 54) konnten durch den Vergleich mit BHM drei weitere Komponenten der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) identifiziert werden. Sie ließen sich alle dem individuellen Komplex IV zuordnen. Komplex IV (~200 kDa) besteht aus insgesamt 13 Untereinheiten, von denen drei (COXI bis COXIII) mitochondrial codiert sind. COXII (Nr. 50), das ein Cu_A Zentrum beinhaltet, dient als Eintrittsstelle für Elektronen, die von Cyt c auf CIV übertragen werden. Von Cu_A werden die Elektronen zu Häm a in der Untereinheit COX1 transferiert und von dort aus auf das Häm a_3/Cu_B Zentrum, wo Sauerstoff zu Wasser reduziert wird [140]. Der Vergleich mit BHM lieferte auch zusätzliche Proteinspots für die bereits identifizierten α - und β -Untereinheiten von Komplex V (ATPA, Nr. 110; ATPB, Nr. 111). Diese Proteinspots waren Teil von Komplex V Trimer.

Die Identifizierung von Proteinspots in 2D-Gelen über 2D Western Blots bzw. durch den Vergleich des Proteinspotmusters verschiedener Organismen führte zu 19 weiteren bekannten Proteinen für OLN-93. Für SH-SY5Y konnten so 22 weitere Proteine erhalten werden. Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 60 Proteine für OLN-93 in 2D-Gelen identifiziert, von denen 43 (72%) in Mitochondrien lokalisiert waren. 33 (61%) der insgesamt 54 Proteine, die in 2D-Gelen mit SH-SY5Y definiert werden konnten, befanden sich in den Mitochondrien. Abschließend lässt sich sagen, dass die Mitochondrienfraktion zwar mit dem ER und Cytosol "verunreinigt" war, aber trotzdem hauptsächlich mitochondriale Proteine identifiziert werden konnten.

A OLN-93



B SH-SY5Y

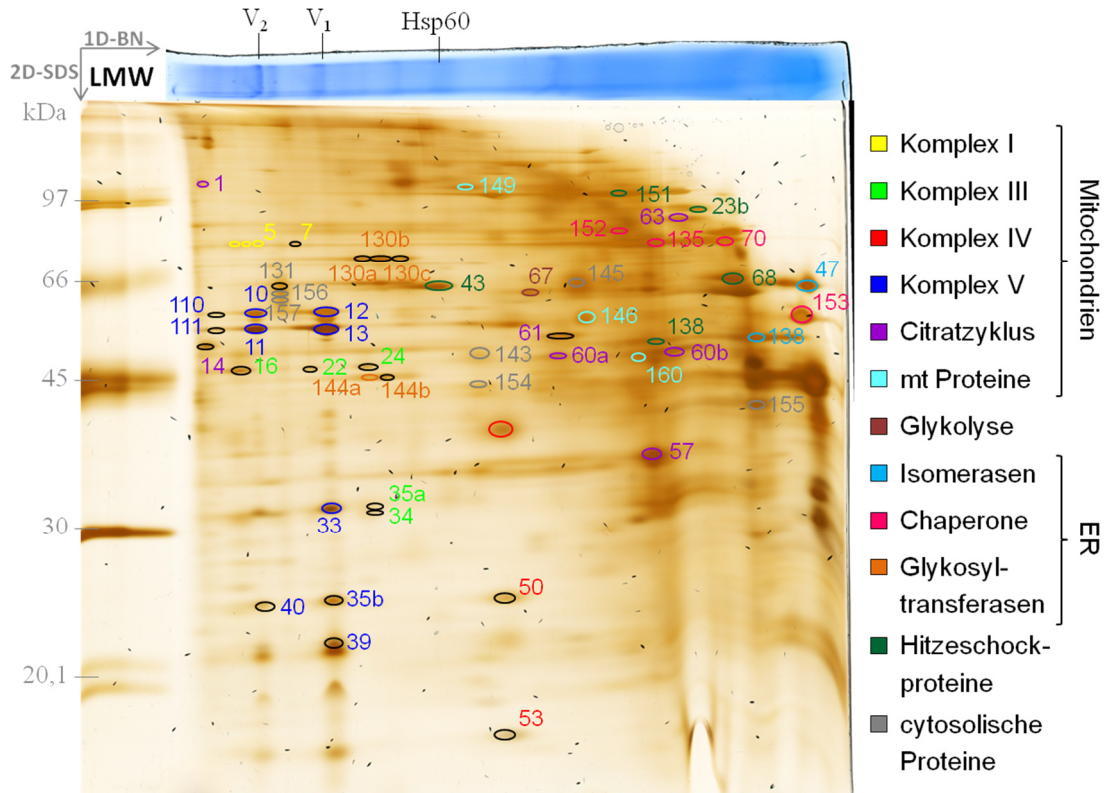


Abb. 44: Identifizierte Proteine aus (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y in 2D-Gelen durch PMF, Western Blot oder Vergleich mit Daten anderer Organismen. Farbige Kreise ohne Spotnummern markieren Proteine, die in dieser Arbeit mittels 2D Western Blot detektiert wurden.

Proteine, die in 2D-Gelen mit BHM an identischer Stelle gefunden wurden, sind schwarz umrandet und sind durch eine farbige Spotnummer gekennzeichnet (Tab. 27 ordnet den Spotnummern Proteinnamen zu). Gleiches gilt für den Vergleich von OLN-93 und SH-SY5Y zueinander (Spotnummern siehe Tab. 26).

Tab. 27: Zusätzlich identifizierte Proteine in 2D-Gelen durch den Vergleich mit BHM. "Nr." entspricht der Spotnummer, die einem Protein im 2D-Gel zugeordnet wurde (siehe Abb. 44); "Proteinname" beschreibt den vollständigen Namen des Proteins, wie er in der UniProt Datenbank eingetragen ist; "Abkürzung" steht für die Kurzform des Proteinnamens sowie der Taxonomie, anhand dessen das Protein in der UniProt Datenbank gefunden werden kann; "MW [kDa]" gibt die Molekülmasse in Kilodalton an.

Nr.	Proteinname	Abkürzung	MW [kDa]
7	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	NDUS1_BOVIN	79.4
104	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2	NDUV2_HUMAN	27.4
22	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	QCR2_RAT	48.4
34	Cytochrome c1	CY1_HUMAN	35.4
35a	Cytochrome b	CYB_HUMAN	42.7
50	Cytochrome c oxidase subunit 2	COX2_RAT	25.9
53	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	COX41_BOVIN	19.6
54	Cytochrome c oxidase subunit 5A	COX5A_RAT	16.1
110	ATP synthase subunit alpha	ATPA_BOVIN	59.7
111	ATP synthase subunit beta	ATPB_HUMAN	56.5

Die Identifizierung von Proteinspots in 2D-Gelen war für die anschließende Bestimmung der Proteinmenge verschiedener Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen und weiteren Proteinen unerlässlich. Über die *steady-state* Proteinmengen konnten OLN-93 und SH-SY5Y Zellen direkt miteinander hinsichtlich ihres Proteoms verglichen werden. Dafür wurden jeweils 120 µM Mitochondrienproteine mittels 2D-BN/SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.21.3). Zur Quantifizierung von Proteinen innerhalb eines 2D-Gels wurden sie mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby gefärbt, weil dieser sowohl einen weiten linearen als auch quantitativen Proteinkonzentrationsbereich aufweist [250, 293] (siehe 4.26.3). Anhand der generierten Gelbilder wurde dann die Quantifizierung des Proteoms mittels der Software Delta2D durchgeführt (siehe 4.27, repräsentative Gelbilder siehe 7.6 A).

Innerhalb der Software wurde ein Fusionsgel erstellt, indem identische Proteinspots auf unterschiedlichen Gelbildern beim sogenannten *Warping* zur Deckung gebracht wurden. Je genauer die Proteinspots zur Deckung gebracht werden, desto besser ist die Qualität des Fusionsgels, das Grundlage für die Quantifizierung ist. Bei dem Vergleich zweier Zelllinien war es eine große Herausforderung das *Warping* präzise zu gestalten. Zudem erschwerten Gel-zu-Gel-Variationen das *Warping*. Auf dem Fusionsgel wurden die zu quantifizierenden Proteinspots markiert (siehe 7.6 B). Im Vergleich zu großen 2D-Gelen war das Auflösungsvermögen mittlerer 2D-Gele geringer, weshalb in diesen Gelen weniger eindeutig definierte Proteinspots gefunden wurden. Proteinspots, deren Spotgrenzen nicht eindeutig definiert

waren, wurden ebenfalls markiert und in den Hintergrund gebracht. Sie dienten der Ermittlung der Gesamtproteinmenge auf dem Gel.

Die markierten Proteinspots auf dem Fusionsgel wurden von der Software auf alle Gelbilder übertragen. Quantifiziert wurden dann die Grauwerte aller Pixel innerhalb einer jeden Spotmarkierung als absolutes Grauwertpixelvolumen V eines jeden Spots. Im Hintergrund wurde gleichzeitig das totale absolute Grauwertvolumen kalkuliert. Der Quotient aus dem absoluten Grauwertpixelvolumen V und dem totalen absoluten Grauwertvolumen ergab das relative Grauwertpixelvolumen $V\%$ für jeden Spot. $V\%$ ist dabei direkt proportional zur Proteinmenge eines Spots (Details zur Quantifizierung siehe 4.27).

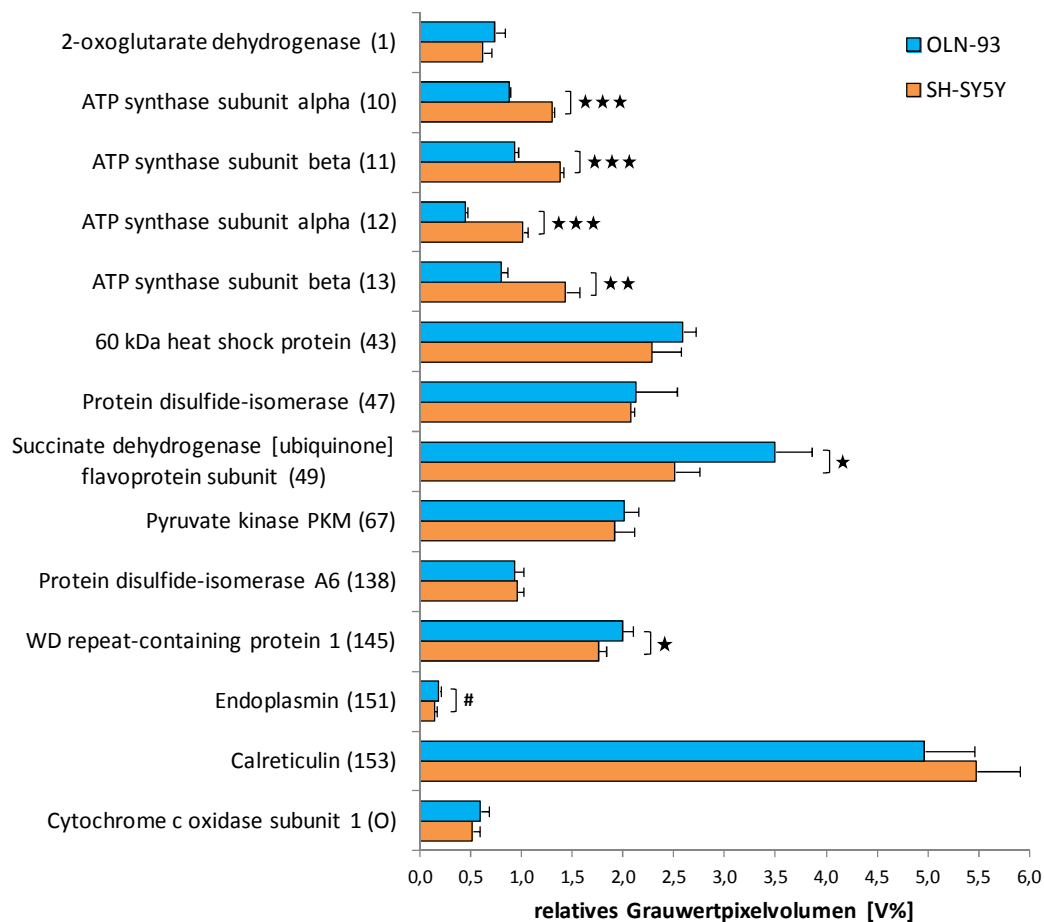
Es wurden insgesamt 27 Proteine quantifiziert, von denen 14 identifiziert waren (siehe Abb. 45). Die beiden Zelllinien unterschieden sich am auffälligsten in den Proteinmengen der α - und β -Untereinheiten von Komplex V Mono- und Dimer (Nr. 10-13). Da Neuronen einen sehr hohen Energiebedarf haben (z.B. für die Reizweiterleitung), war es nicht weiter verwunderlich, dass die Menge von Komplex V Untereinheiten in SH-SY5Y die in OLN-93 überstieg (mind. +48,2%, siehe Abb. 45A). Die Proteinmenge der SDHA Untereinheit von Komplex II (Nr. 49) war jedoch in OLN-93 Zellen größer als die in SH-SY5Y Zellen (+39,2%). Da die Succinat-Dehydrogenase ebenfalls Teil des Citratzyklus ist, könnte dies evtl. auf eine höhere Aktivität des Citratzyklus hindeuten (diese Vermutung wurde durch die vermehrte Proteinmenge an α -Ketoglutarat-Dehydrogenase unterstützt). Für das cytosolische Protein *WD repeat-containing protein 1* sowie das ER-Hitzeschockprotein Endoplasmin wurden ebenfalls größere Proteinmengen in OLN-93 Zellen gefunden (+13,7% bzw. +30,8%). Die Pyruvatkinase (Nr. 67) sowie die Proteindisulfidisomerasen A1 (Nr. 47) und A6 (Nr. 138) wiesen in beiden Zelllinien vergleichbare Proteinmengen auf. Darüber hinaus gab es nicht signifikante Tendenzen. In OLN-93 Zellen wurden größere Proteinmengen an α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (Nr. 1), Hsp60 (Nr. 43) und der COX1 Untereinheit von Komplex IV im Vergleich zu SH-SY5Y Zellen gefunden. Hingegen wies das ER-Chaperon Calreticulin (Nr. 153) in SH-SY5Y Zellen eine höhere Proteinmenge auf.

Interessanterweise wurden signifikant höhere Proteinmengen unidentifizierter Proteine (Nr. 158, 161, 168, 169, 170, 177) ausschließlich in OLN-93 Zellen im Vergleich zu SH-SY5Y Zellen gefunden (siehe Abb. 45B und Tab. 28). Darüber hinaus gab es für die Proteine 162+163 und 181 nicht signifikante Tendenzen zu größeren Proteinmengen in OLN-93 Zellen. Die Proteinmengen der Proteine 160, 172, 174, 176 und 182 waren im Rahmen ihrer Fehlertoleranzen vergleichbar zwischen OLN-93 und SH-SY5Y Zellen. Anhand der bisher nicht identifizierten Proteine könnten weitere wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, um die Unterschiede zwischen OLN-93 und SH-SY5Y Zellen besser zu charakterisieren. Die weitere Identifizierung von Proteinspots auf 2D-Gelen mit OLN-93 und SH-SY5Y Proben ist somit erforderlich.

Tab. 28: Signifikante Unterschiede in der Proteinmenge von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.
 Angegeben ist der Unterschied der Proteinmenge, die sich aus dem Quotienten Protein x (SH-SY5Y) und Protein x (OLN-93) ergibt.

Nr.	Proteinname	Unterschied [%]	p-Wert
10	ATP synthase subunit alpha	+48,92	3,1E-05
11	ATP synthase subunit beta	+48,17	0,0002
12	ATP synthase subunit alpha	+128,62	0,0006
13	ATP synthase subunit beta	+80,64	0,0053
49	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	-28,14	0,0211
145	WD repeat-containing protein 1	-12,03	0,0412
151	Endoplasmin	-23,55	0,0697
158	Nicht identifiziert	-20,43	0,0556
161	Nicht identifiziert	-23,35	0,0423
168	Nicht identifiziert	-20,69	0,0251
169	Nicht identifiziert	-16,87	0,0705
170	Nicht identifiziert	-41,39	0,0001
177	Nicht identifiziert	-24,02	0,0344

A Identifizierte Proteine



B Unidentifizierte Proteine

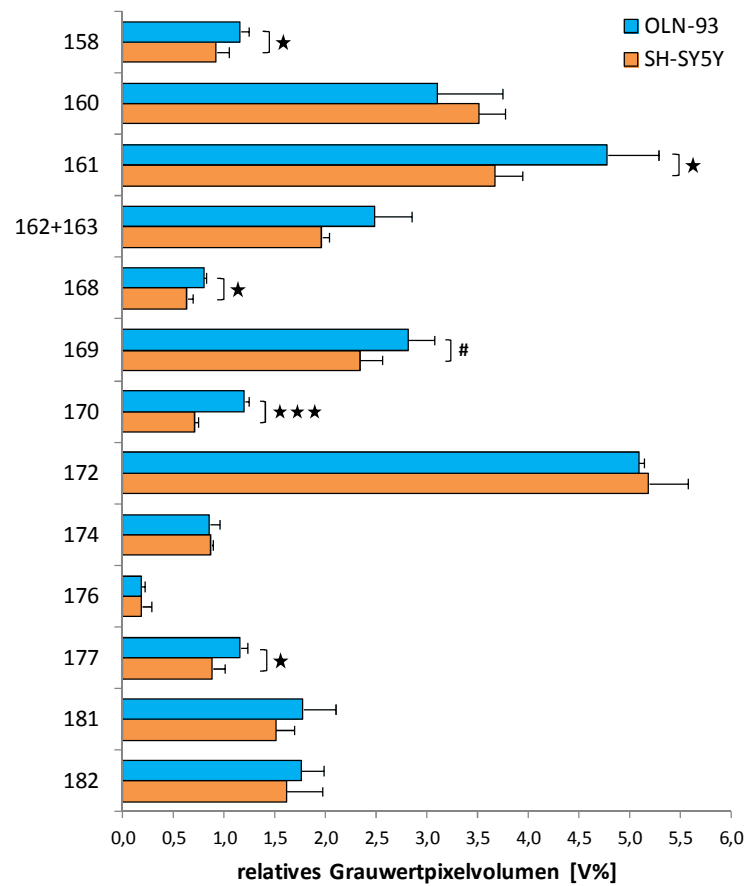


Abb. 45: Unterschiede in der Proteinmenge von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen. (A) Identifizierte und (B) bisher nicht identifizierte Proteinspots in 2D-Gelen wurden mittels der Software Delta2D quantitativ analysiert. SH-SY5Y Zellen enthielten signifikant größere Mengen an Komplex V Untereinheiten (Nr. 10-13) als OLN-93 Zellen. In OLN-93 Zellen wurden hingegen signifikant größere Mengen der Komplex II Untereinheit SDHA (Nr. 49) sowie von *WD repeat-containing protein 1* (Nr. 145) gefunden. Unidentifizierte Proteine zeigten signifikant höhere Proteinmengen für OLN-93 Zellen. (n = 3, MW ± Stabw, ***: p ≤ 0,001, **: p ≤ 0,01, *: p ≤ 0,05, #: p ≤ 0,01)

Da nicht für alle Atmungskettenkomplexe Untereinheiten innerhalb der 2D-Gele quantifiziert werden konnten, wurde versucht die Gesamtproteinmenge einer speziellen Untereinheit eines jeden Atmungskettenkomplexes zu quantifizieren. Dafür wurden 70 µg Mitochondrienproteine mit SDS-Probenauflaufspuffer versetzt, gekocht und in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.21.1). Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen mit spezifischen Antikörpern immunochemisch nachgewiesen (siehe 4.23 und Abb. 46A). Die Quantifizierung der erhaltenen Banden ergab teilweise gegensätzliche Ergebnisse für den Vergleich der beiden Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Zudem unterschieden sich die Bandenintensitäten häufig (Daten nicht gezeigt). Eine vertrauenswürdige Auswertung war somit nicht möglich. Bei den Atmungskettenkomplexen handelt es sich um Membranproteine, die durch die Art der Probenvorbereitung für eine SDS-PAGE aggregieren und ausfallen können [250]. Durch Reduktion der Inkubationstemperatur auf 37°C sollte sich dieses Problem beheben lassen. Die Firma Abcam zeigte für Rattenlebermitochondrien, dass Untereinheiten von Komplex I bis V ohne Proteinverlust im Western

Blot detektiert werden können, wenn die Proben vor der SDS-PAGE auf 37°C erhitzt wurden [355]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden allerdings verschmierte Proteinbanden erhalten, die sich über einen weiten Massenbereich erstreckten (bis zu 40 kDa), wenn die Proben vor der SDS-PAGE bei 37°C inkubiert wurden (Abb. 46B). Eine Quantifizierung der Gesamtproteinmenge von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe im Western Blot konnte somit nicht realisiert werden.

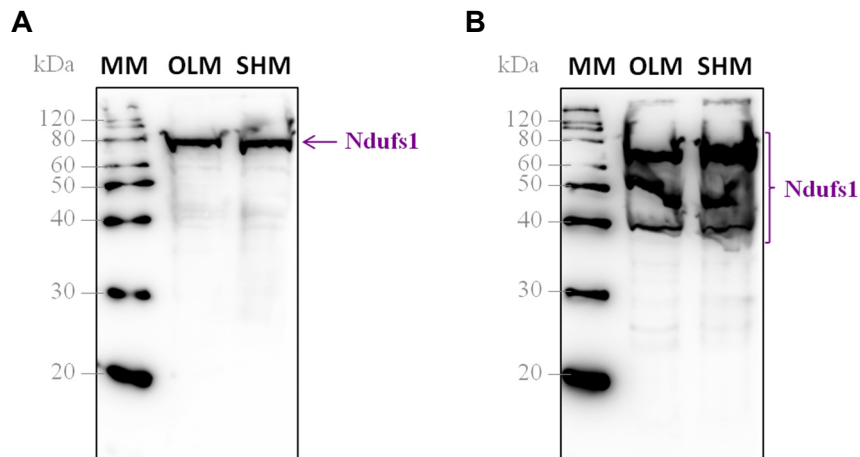


Abb. 46: Nachweis von Atmungskettenkomplexen in OLM und SHM im Western Blot am Beispiel der Komplex I Untereinheit Ndufs1. Jeweils 70 µg Mitochondrienproteine wurden mit SDS-Probenpuffer entweder (A) für 5 min bei 95°C oder (B) für 30 min bei 37°C inkubiert. Solubilisierte Mitochondrienproteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, gefolgt von einem Western Blot. Das Erhitzen auf 95°C führte zu einer klar definierten Bande. Durch die Inkubation bei 37°C wurde ein Schmier entlang eines großen Massenbereiches erhalten. Der Vergleich der beiden Probenvorbereitungen zeigte, dass bei 95°C eine geringere Proteinmenge in der Bande detektiert wurde.

Eine weitere Option war die Quantifizierung von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe mittels 2D Western Blot (siehe 4.21.3 und 4.23). Im Gegensatz zu den kürzlich beschriebenen Western Blots, boten 2D Western Blots den Vorteil, dass die Proben bei RT im Gel denaturiert wurden. Hier machten es aber die Gel-zu-Gel-Variationen unmöglich, einzelne Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen zu quantifizieren, weshalb sie ausschließlich für die Identifikation von Atmungskettenkomplexen in 2D-Gelen genutzt werden konnten (siehe Anfang dieses Kapitels). Darüber hinaus ist bei der Quantifizierung von Western Blots immer zu berücksichtigen, dass ein gleichmäßiger Transfer für alle Proteine über die gesamte Fläche zwischen Gel und Nitrozellulosemembran nicht sichergestellt werden kann. Daher sind die aus der Quantifizierung von Western Blots erhaltenen Daten häufig mit Fehlern behaftet. In der Praxis wird durch die Darstellung des regelmäßigen Transfers eines sogenannten *housekeeping* Proteins wie z.B. β -Aktin suggeriert, dass auf der gesamten Membranfläche ein einheitlicher Transfer stattgefunden hat, was meines Erachtens nicht der Fall sein muss. Abgesehen davon könnte das *housekeeping* Protein von der Art der Behandlung (z.B. Inkubation mit A β Peptiden, Röntgenstrahlung) beeinflusst sein.

5.3 Einfluss von A β ₁₋₄₂ Mono- und Oligomeren auf OLN-93 und SH-SY5Y Zellen

5.3.1 A β ₁₋₄₂ wurde in Mitochondrien und anderen Zellkompartimenten lokalisiert

Um sicherzustellen, dass mono- und niedrige oligomere Formen des A β ₁₋₄₂ Peptids für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente verwendet wurden, wurde das Peptid disaggregiert. Dafür wurde das lyophilisierte Peptid in Trifluoressigsäure im Ultraschallbad vollständig gelöst (siehe 4.7). Nach dem Verdampfen der Trifluoressigsäure wurde es in DMSO gelöst und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert. Ein Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen A β ₁₋₄₂ (ms- α -A β ₁₋₄₂) nach der elektrophoretischen Auftrennung des disaggregierten Peptids in einem 18%igen SDS-Gel (siehe 4.21.1 und 4.23) bestätigte, dass es als Mono- und Dimer sowie als niedere Oligomere vorlag (siehe Abb. 47).

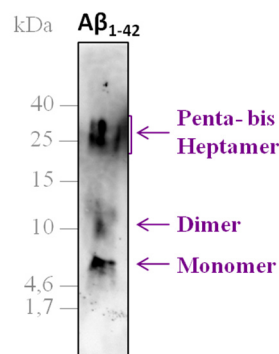


Abb. 47: Disaggregation von A β ₁₋₄₂ Peptiden mit Trifluoressigsäure resultierte in Mono- und Dimeren sowie niederen Oligomeren. Disaggregiertes A β ₁₋₄₂ wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wurden verschiedene A β ₁₋₄₂ Spezies detektiert.

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Versuchsaufbau sah die externe Applikation der OLN-93 und SH-SY5Y Zellen mit A β ₁₋₄₂ Mono- und Oligomeren für 24 h vor. Deshalb musste zunächst die Interaktion des Peptids mit den Zellen untersucht werden. Dafür wurden adhärent wachsende Zellen für 24 h mit 1,0 μ M FITC-A β ₁₋₄₂ inkubiert und anschließend mit dem Durchflusszytometer analysiert (siehe 4.9 und 4.13). Für beide Zelllinien wurde in FITC-A β ₁₋₄₂-behandelten Proben eine Verschiebung der Zellpopulation in Richtung höherer Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu unbehandelten/ungefärbten Proben beobachtet (siehe Abb. 48A). Die Fluoreszenzintensität erhöhte sich dabei um das 12,4-fache für OLN-93 Zellen und um das 6,3-fache für SH-SY5Y Zellen (siehe Abb. 48B). Damit wurde gezeigt, dass die Zellen mit dem synthetischen Peptid interagierten. Für eine Aussage über die exakte Lokalisation des Peptids wäre eine Kofärbung mit einem weiteren Farbstoff, der spezifisch verschiedene Kompartimente wie z.B. die Mitochondrien oder die Endosomen/Lysosomen anfärbt, erforderlich gewesen. Zur besseren Auflösung wurde die Lokalisationsstudie am Konfokalmikroskop durchgeführt.

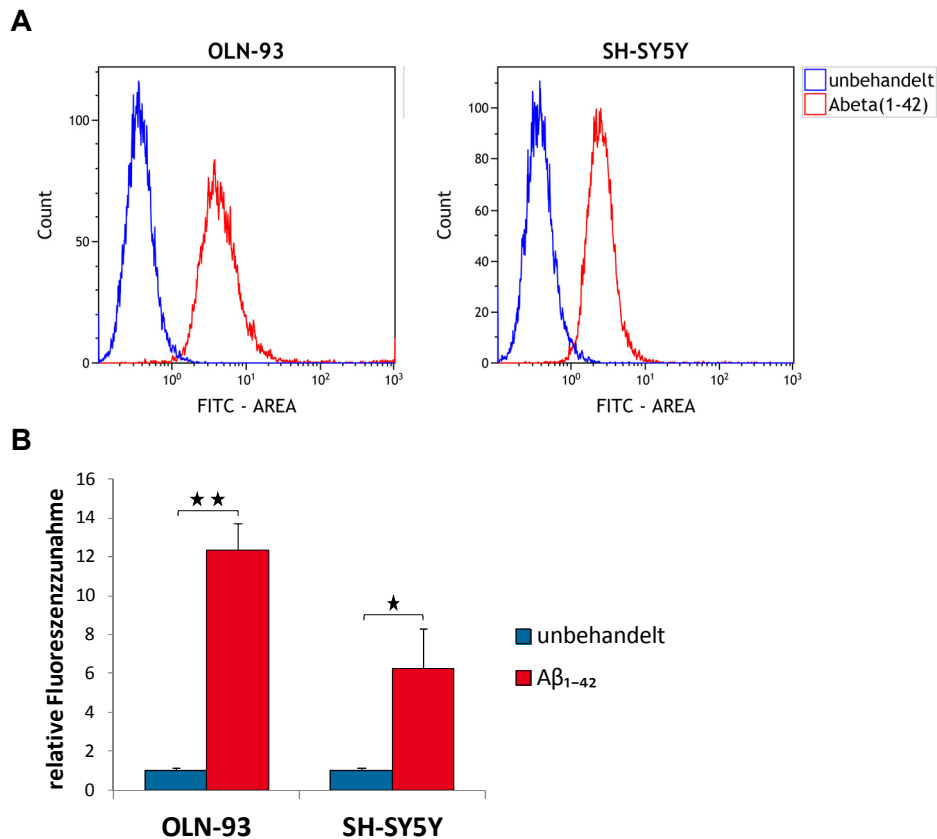


Abb. 48: Interaktion von Aβ₁₋₄₂ mit OLN-93 und SH-SY5Y Zellen. (A) FITC-Aβ₁₋₄₂ (1,0 μM) wurde in beiden Zelllinien nach einer Inkubationszeit von 24 h durchflusszytometrisch nachgewiesen. (B) Quantifizierung der Populationsverschiebung in Richtung höherer Fluoreszenzintensitäten (N = 3, MW ± Stabw, ★★: p ≤ 0,01, ★: p ≤ 0,05).

Vorversuche am Einzelmolekül-Setup von PD Dr. Tobias Meckel ließen vermuten, dass das extern applizierte Peptid nicht sehr schnell in die Zellen aufgenommen wird (Daten nicht gezeigt). Nach ca. dreistündiger Inkubation mit 200 nM FITC-Aβ₁₋₄₂ (siehe 4.9 und 4.14) wurde keine Kolo-kalisation von Mitochondrien und dem Peptid sowohl in OLN-93 als auch in SH-SY5Y Zellen, transfiziert mit tagBFP-mito, beobachtet (siehe Abb. 49 und 7.7 A). Die Mitochondrien bildeten lange, fadenförmige Strukturen aus, wohingegen das Peptid intrazellulär in runden Strukturen gefunden wurde. Da vermutet wurde, dass es sich bei den runden Strukturen um Vesikel handeln könnte, wurden untransfizierte Zellen nach ca. fünfstündiger Inkubation mit 200 nM FITC-Aβ₁₋₄₂ für 10 min mit 10 nM LysoTracker® Red DND-99 (LTR) behandelt (siehe 4.9). Das Peptid konnte so in sauren Organellen, die spezifisch von LTR angefärbt wurden, sowohl in OLN-93 als auch in SH-SY5Y Zellen lokalisiert werden (siehe Abb. 50 und 7.7 B). Aufgrund der Nähe zum Nukleus handelte es sich bei den sauren Organellen sehr wahrscheinlich um späte Endosomen. Hu et al. [356] kamen zu der gleichen Schlussfolgerung als sie nach 24-stündiger Inkubation mit 250 nM Tetramethylrhodamin(TMR)-Aβ₁₋₄₂ eine Kolo-kalisation mit sauren Organellen (50 nM LysoTracker® Green DND-26) in SH-SY5Y Zellen am Konfokalmikroskop beobachteten. Sie zeigten auch, dass die zelluläre Aufnahme des Aβ₁₋₄₂ Peptids unabhängig vom gekoppelten Fluorophor ist (FITC-Aβ₁₋₄₂ und TMR-Aβ₁₋₄₂ verhielten sich gleich) und dass ein ungekoppelter Fluorophor nicht ins Zellinnere transportiert wird. Des Weiteren fanden Hu et al. heraus, dass das Peptid

erst nach 2 h in den Vesikeln lokalisiert ist, was die Vermutungen bestätigte, die sich aus unseren anfänglichen Einzelmolekülmessungen ergeben hatten. Auch in sauren Organellen der murinen Oligodendrozyten-Vorläufer-Zelllinie NG2 wurde das A β ₁₋₄₂ Peptid (400 nM für 24 h, N-terminal gekoppelt mit HiLyte™ Fluor 488) gefunden [357].

Demzufolge scheinen A β ₁₋₄₂ Peptide über die Endosomen zu anderen Organellen zu gelangen. In der vorliegenden Arbeit wurde es nach ca. 16 h in den Mitochondrien von tagBFP-mito transfizierten Zellen nachgewiesen (siehe 4.9, Abb. 51 und 7.7 C). Dabei zeigten OLN-93 Zellen eine ausgeprägte Kolokalisation, wohingegen in SH-SY5Y nur wenige A β ₁₋₄₂ Peptide in Mitochondrien lokalisiert wurden. Auch Hansson Petersen et al. [151] zeigten für fixierte SH-SY5Y Zellen lediglich eine partielle Kolokalisation von Mitochondrien (MitoTracker® Orange CMTMRos) und A β ₁₋₄₀ (1,0 μ M, N-terminal gekoppelt mit HiLyte™ Fluor 488) nach 18 h. Die geringe mitochondriale Lokalisation in neuronalen Zellen ist jedoch nicht weiter verwunderlich, weil A β Peptide in keinem Organell bevorzugt gefunden werden [102, 358]. In Oligodendrozyten hingegen scheint das A β ₁₋₄₂ Peptid eine hohe Affinität für Mitochondrien zu besitzen (siehe Abb. 51).

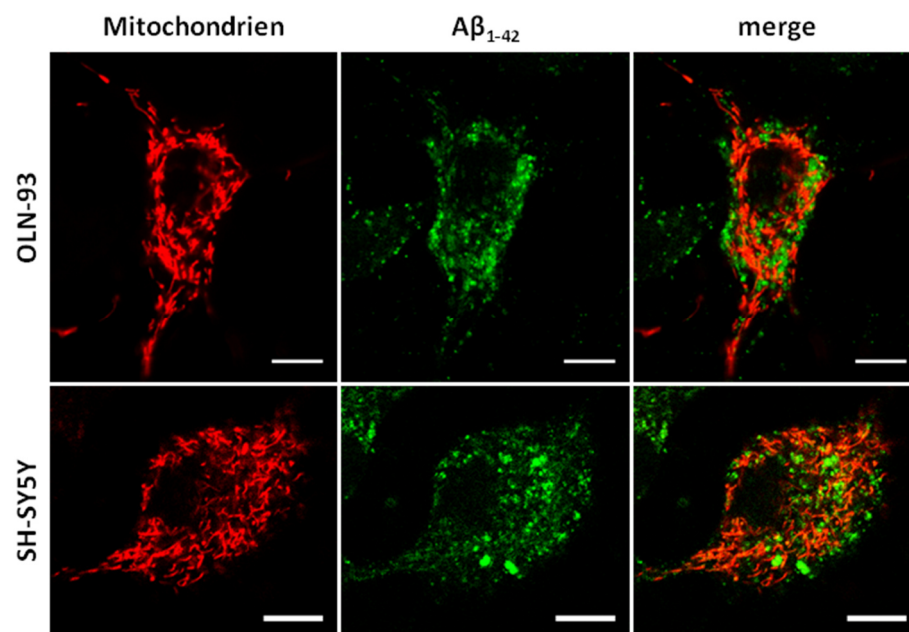


Abb. 49: Keine Kolokalisation von Mitochondrien und extern appliziertem A β ₁₋₄₂ nach 3 h. In den Mitochondrien von tagBFP-mito transfizierten OLN-93 und SH-SY5Y Zellen (rot) wurde nach ca. dreistündiger Inkubation mit 200 nM FITC-A β ₁₋₄₂ (grün) kein Peptid nachgewiesen. (Größenmaßstab: 10 μ m)

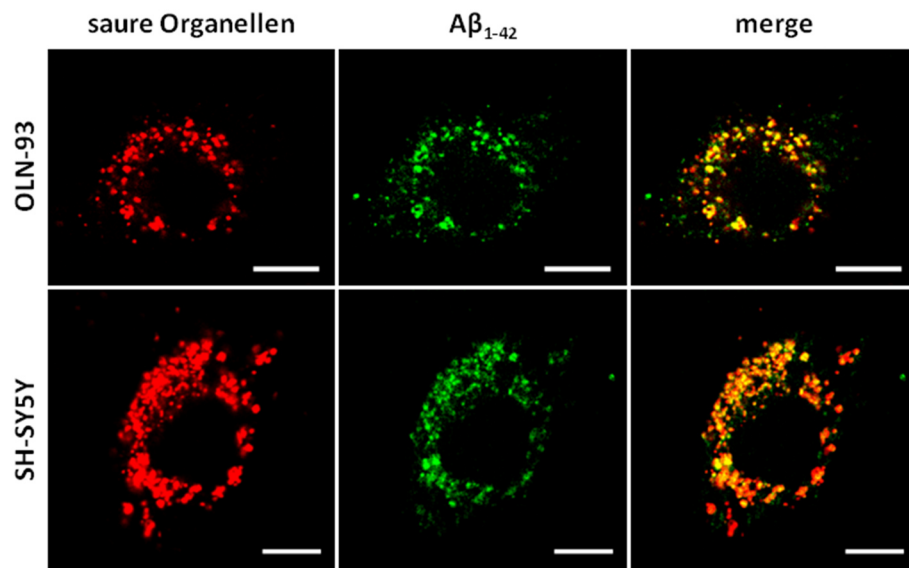


Abb. 50: Lokalisation von extern appliziertem $A\beta_{1-42}$ Peptid in späten Endosomen nach 5 h. OLN-93 und SH-SY5Y Zellen wurden jeweils für ca. 5 h mit je 200 nM FITC- $A\beta_{1-42}$ (grün) inkubiert und dann für 10 min mit 10 nM LysoTracker® Red DND-99 (rot). In OLN-93 wurde ein Großteil des Peptids, in SH-SY5Y fast das gesamte Peptid in sauren Organellen, bei denen es sich um späte Endosomen handeln dürfte, gefunden (Überlagerung: gelb). (Größenmaßstab: 10 μ m)

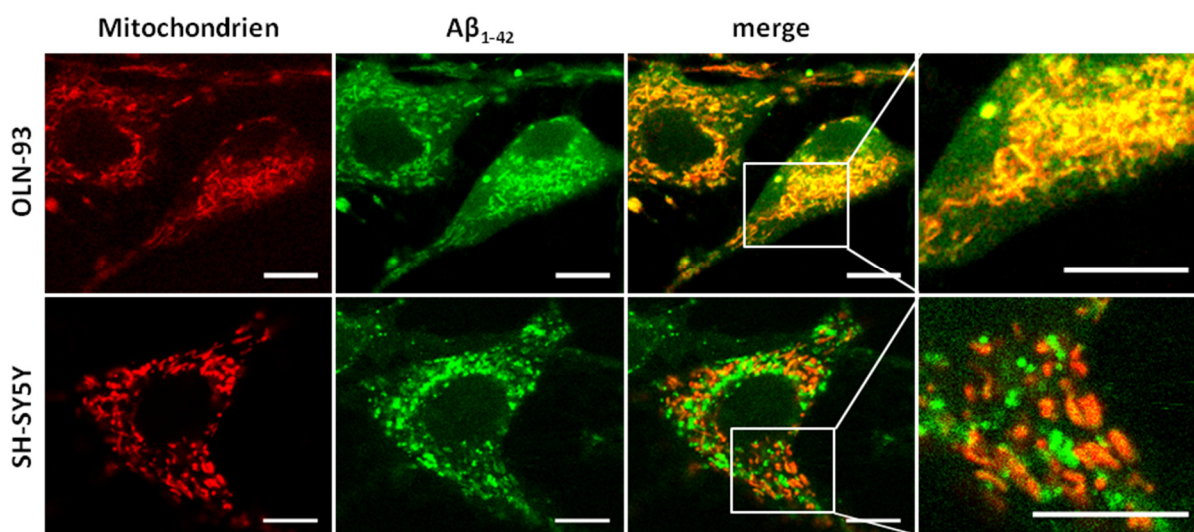


Abb. 51: Nachweis von extern appliziertem $A\beta_{1-42}$ Peptid in den Mitochondrien von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen. TagBFP-mito transfizierte Zellen (rot) wurden mit 200 nM FITC- $A\beta_{1-42}$ (grün) für ca. 16 h inkubiert. In den Mitochondrien von OLN-93 Zellen wurde fast das gesamte Peptid gefunden (Überlagerung: gelb). In SH-SY5Y Zellen kam es lediglich zu einer geringen Kolo-kalisation von Mitochondrien und dem Peptid (Überlagerung: orange). (Größenmaßstab: 10 μ m)

5.3.2 A β ₁₋₄₂ zeigte keine direkte Wirkung auf die Zellviabilität

Nach der intrazellulären Lokalisation von A β ₁₋₄₂ Peptiden wurde der Einfluss des Peptids auf die allgemeine Zellphysiologie untersucht. Dies wurde durch die Analyse der lysosomalen und metabolischen Aktivität der Zellen erreicht.

Der Neutralrot-Aufnahmetest eignet sich zur Bestimmung des Anteils lebender Zellen in einer Zellpopulation (Zellviabilität), weil der Farbstoff Neutralrot ausschließlich im sauren Milieu der Lysosomen vitaler Zellen akkumuliert [219, 220]. In der vorliegenden Arbeit wurden OLN-93 und SH-SY5Y Zellen mit Neutralrot für 2 h inkubiert. Für die Messung wurde der akkumulierte Farbstoff aus den Zellen mit einer sauren Ethanollösung extrahiert (siehe 4.10.1). Es wurde angenommen, dass die Menge des extrahierten Farbstoffes proportional zur Anzahl lebender Zellen ist [218]. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten für unbehandelte Proben galten als Maß für die physiologische Zellviabilität und wurden deshalb auf 100% gesetzt (siehe Abb. 52). Für OLN-93 Zellen wurde so in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten Proben eine nicht signifikante Abnahme der Zellviabilität um 5,6% erhalten. A β ₁₋₄₂ zeigte keinen Einfluss auf die Zellviabilität für SH-SY5Y Zellen (+0,3%).

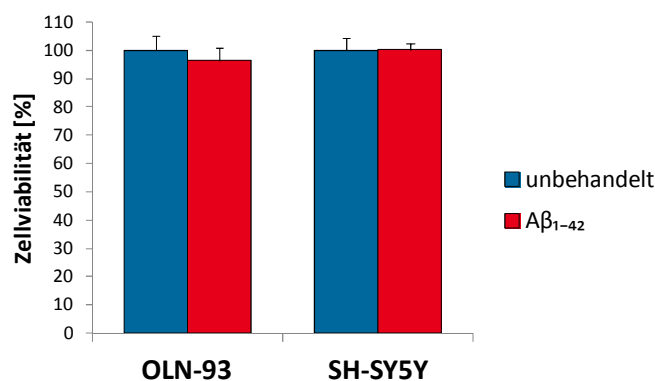


Abb. 52: Keine signifikante Änderung der Zellviabilität durch A β ₁₋₄₂. Die Anzahl lebender Zellen wurde über die Akkumulation von Neutralrot in Lysosomen ermittelt. In A β ₁₋₄₂-behandelten OLN 93 Proben nahm die Zellviabilität leicht ab. Für SH-SY5Y Zellen veränderte sich die Zellviabilität durch A β ₁₋₄₂ nicht. (OLN-93: N = 4, n = 3, SH-SY5Y: N = 5, n = 3, MW \pm Stabw, nicht signifikant)

Eine weitere Möglichkeit auf die Zellviabilität zu schließen ist die Quantifizierung der metabolischen Aktivität mittels alamarBlue® (Handelsname des Redox-Farbstoffs Resazurin). Dafür wurden die Zellen für 4 h mit alamarBlue® inkubiert (siehe 4.10.2). Resazurin wird im reduzierenden Milieu des Cytosols lebender Zellen zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt. Die Reduktion des Farbstoffs geht dabei mit der metabolischen Aktivität einher und gilt daher als Maß für die Zellviabilität [221]. Wie beim Neutralrot-Aufnahmetest wurden die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten für unbehandelte Proben auf 100% gesetzt, weil sie die physiologische Zellviabilität darstellen (siehe Abb. 53). Für beide Zelllinien wurde eine nicht signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität erhalten. A β ₁₋₄₂-behandelte OLN-93 Proben wiesen eine 11,5% höhere metabolische Aktivität auf, wohingegen der A β ₁₋₄₂-induzierte Anstieg für SH-SY5Y Zellen lediglich 2,9% betrug. Im Rahmen der Fehlertoleranz dürfte A β ₁₋₄₂ jedoch keine Auswirkung auf SH-SY5Y Zellen gehabt haben.

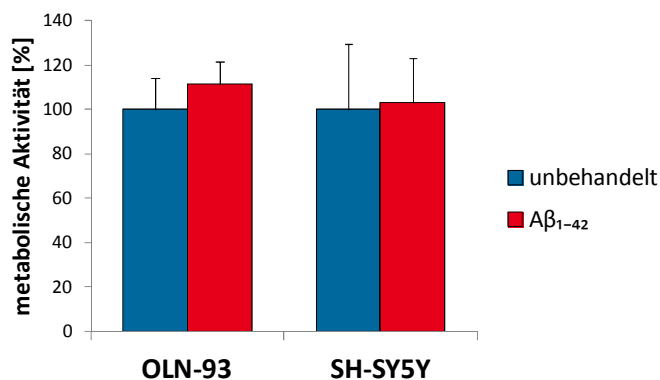


Abb. 53: Keine signifikante Aβ₁₋₄₂-induzierte Wirkung auf die metabolische Aktivität von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen. Die metabolische Aktivität wurde anhand der Reduktion von alamarBlue® in lebenden Zellen ermittelt. (N = 7, n = 3, MW ± Stabw, nicht signifikant)

Sowohl der Neutralrot-Aufnahmetest als auch der alamarBlue® Test wurden in der Anfangsphase der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Da jeweils die Mitführung einer Positivkontrolle versäumt wurde, kann an dieser Stelle nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass Aβ₁₋₄₂ wirklich keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität hatte.

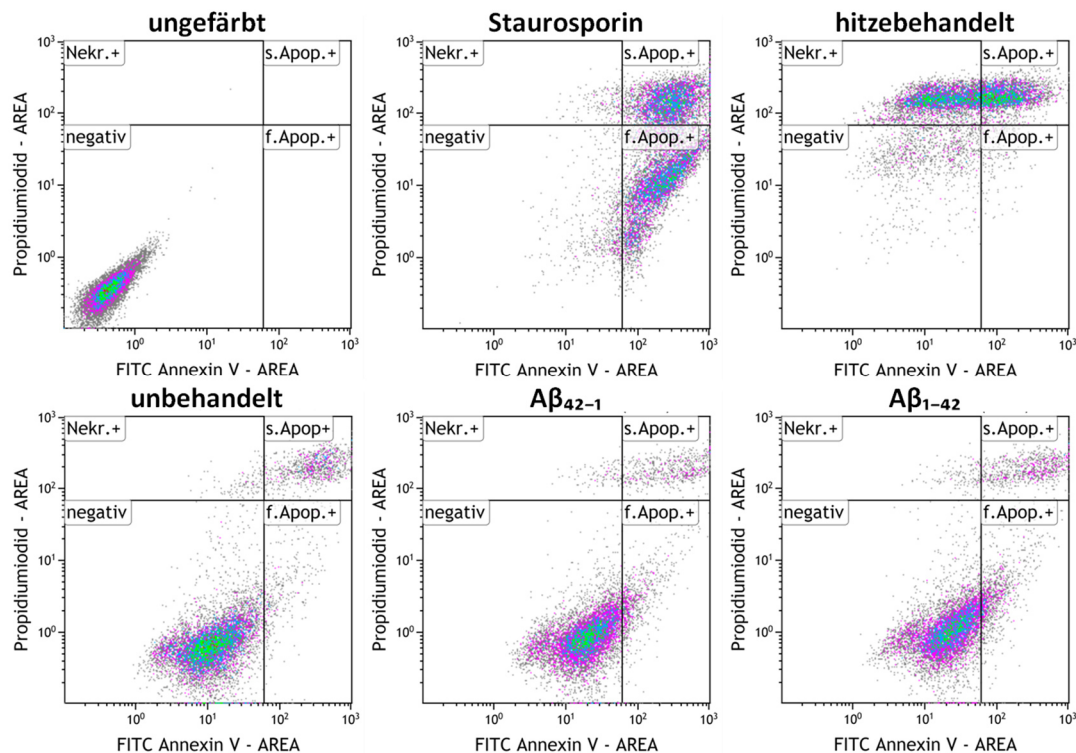
In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit zeigten He et al. [359] ebenfalls einen kleinen Anstieg der metabolischen Aktivität (nicht signifikant, bestimmt mit alamarBlue®) in primären kortikalen Neuronen aus Spargue-Dawley Ratten im embryonalen Stadium E17 nach der Behandlung mit 1,0 μM Aβ₁₋₄₂ für 24 h. Die etwas gestiegene metabolische Aktivität könnte auf eine höhere Glykolyseaktivität zurückzuführen sein oder darauf, dass Prozesse gestört sind, die NADH als Reduktionsmittel nutzen. In der Literatur kommen sowohl der alamarBlue® Test als auch der Neutralrot-Aufnahmetest eher selten zur Anwendung, auch wenn es sich dabei um Standard-Zytotoxizitätstests handelt. Law et al. [360] fanden in gemischten kortikalen Glia- und neuronalen Kulturen, die aus Spargue-Dawley Ratten im embryonalen Stadium E19 generiert wurden, eine signifikante Abnahme der Zellviabilität nach 20 h Aβ₁₋₄₂ Inkubation (MTT Test). Durch 1,0 μM Aβ₁₋₄₂ reduzierte sich die Zellviabilität um 18% und durch 5,0 μM um 26%.

In der Literatur wird häufig der sogenannte MTT Test zur Bestimmung der Zellviabilität eingesetzt [361-372]. Dabei wird ein gelbes Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem violetten Formazan reduziert. Diese Reduktion erfolgt in Anwesenheit von NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktasen, die im Cytosol lokalisiert sind. Der MTT Test misst somit wie der alamarBlue® Test die metabolische Aktivität der Zelle. Im Gegensatz zu alamarBlue® wird das Tetrazoliumsalz allerdings nicht von Cytochromen reduziert [373]. Dies könnte erklären, warum mit dem MTT Test eine Abnahme der Zellviabilität bestimmt wurde, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit dem alamarBlue® Test nicht erhalten wurde. In der Literatur wurde ein Rückgang der Zellviabilität von 30-58% durch Aβ₁₋₄₂ beobachtet. Dieser Rückgang war unabhängig vom Modellorganismus (humane SH-SY5Y Zellen, murine PC12 Zellen, primäre Neuronen aus Ratten- oder Mausembryonen), der verwendeten Aβ Isoform (Aβ₁₋₄₂ oder Aβ₂₅₋₃₅) sowie der Konzentration (2,0 bis 50 μM) und der Inkubationszeit (24, 48 oder 72 h) mit der jeweiligen

A β Isoform [361-370]. Interessanterweise änderte sich die Zellviabilität in der murinen Neuroblastomzelllinie N2a, die APP695 oder APP_{swe} exprimierten, im Vergleich zur Kontrolle nicht [371], wohingegen in primären neuronalen Kulturen aus APP/PS1 Mausembryonen eine Abnahme der Zellviabilität um 30% erhalten wurde [372]. Es wurde daher davon ausgegangen, dass eine hohe intraneuronale A β ₁₋₄₂ Konzentration ursächlich für die Abnahme der Zellviabilität ist. Da der MTT Test unabhängig von der Reduktionskraft von Cytochromen ist [373], scheint es wahrscheinlich, dass NADH- bzw. NADPH-generierende Prozesse wie z.B. die Glykolyse oder der Pentosephosphatweg durch A β ₁₋₄₂ Peptide beeinträchtigt werden.

Da die Zellviabilitätstests einen A β ₁₋₄₂ Effekt aufgrund fehlender Kontrollen nicht mit Sicherheit ausschließen konnten, wurde untersucht, ob der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen durch A β ₁₋₄₂ Behandlung zunahm. Dafür wurden Zellen mit FITC Annexin V und Propidiumiodid gefärbt (siehe 4.10.3). In der frühen Phase der Apoptose ermöglicht die Verlagerung von Phosphatidylserinen auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran deren Erkennung durch das Phospholipidbindeprotein Annexin V [224, 225], wohingegen Propidiumiodid erst in der späten Phase der Apoptose nach Verlust der Integrität der Plasmamembran in die DNA interkalieren kann. Da bei der Nekrose ebenfalls die Integrität der Plasmamembran verloren geht, können mit dieser Methode Zellen in der späten Phase der Apoptose nicht von nekrotischen Zellen unterschieden werden. Dies wird in Abb. 54A durch Zellen, die für 24 h mit 1,0 μ M Staurosporin behandelt wurden (PK Apoptose) bzw. für 15-20 min auf 60°C erhitzt wurden (PK Nekrose) deutlich. Der Mechanismus, wie Staurosporin Apoptose induziert, ist zwar noch nicht vollständig geklärt [374, 375], dennoch wird es als zuverlässiger Apoptoseinduktor eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Staurosporinbehandlung zwischen früh- (f.Apop.+) und spät-apoptotischen (s.Apop.+) Zellen mittels Durchflusszytometrie unterschieden werden (siehe Abb. 54A). Hyperthermie hingegen führte zur Nekrose (Nekr.+ und s.Apop.+). Durch A β ₁₋₄₂ Behandlung änderte sich der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen im Vergleich zu unbehandelten Proben so gut wie nicht (+1,6% für OLN-93 und +0,4% für SH-SY5Y, siehe Abb. 54B). Dies bedeutete, dass A β ₁₋₄₂ Peptide den programmierten Zelltod nicht induzieren.

A



B

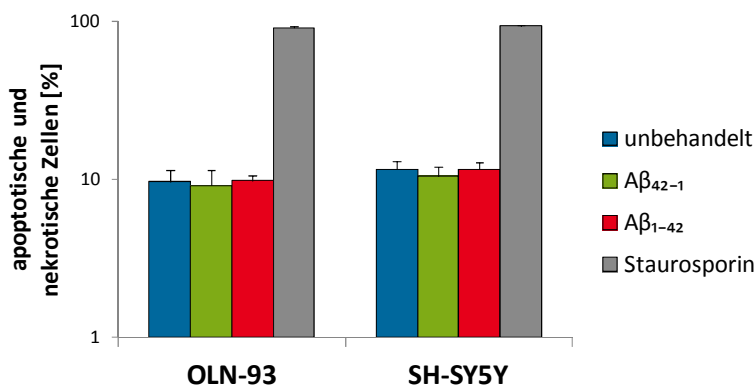


Abb. 54: Gleichbleibender Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen nach $A\beta_{1-42}$ Behandlung. (A) OLN-93 und SH-SY5Y Zellen wurden mit FITC Annexin V (Apoptosemarker) und Propidiumiodid (Nekrosemarker) gefärbt und hinsichtlich apoptotischer und nekrotischer Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Datenset für OLN-93 Zellen inklusive Positivkontrollen für Apoptose (Staurosporin) und Nekrose (hitzebehandelt). (B) Die Quantifizierung apoptotischer und nekrotischer Zellen (Summe aus f.Apop.+ und s.Apop.+) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten, $A\beta_{42-1}$ - und $A\beta_{1-42}$ -behandelten Proben. (N = 6, MW \pm Stabw, nicht signifikant)

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit fanden He et al. [376] in neuronalen Stamm-/Vorläufer-Zellen (*neural stem/progenitor cells*, NSPCs) gewonnen aus dem Hippocampus von 8-Wochen alten C575L/6 Mäusen keine Änderung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Behandlung mit 2,5 μ M bzw. 5,0 μ M $A\beta_{1-42}$ für 5 Tage. Unter Verwendung von 10 μ M $A\beta_{1-42}$ nahm der Anteil um ca. 3% zu. Demnach werden zur Apoptose-induktion hohe Konzentrationen an $A\beta_{1-42}$ benötigt. Es ist aber auch denkbar, dass $A\beta_{1-42}$ keinen Einfluss auf die Apoptose hat.

Apoptose wird häufig über Caspasen ermittelt, die sowohl beim extrinsischen als auch beim intrinsischen Weg des programmierten Zelltods zentrale Funktionen einnehmen. Es besteht die Möglichkeit die Caspaseaktivität über synthetische Substrate zu messen oder die Menge an aktivierten Effektorcaspasen zu quantifizieren [377]. Aktivierte Effektorcaspasen degradieren diverse Substrate innerhalb einer apoptotischen Zelle. Unter physiologischen Bedingungen existieren sie als inaktive Zymogene, sogenannte Procaspasen. Im Verlauf der Apoptose werden sie durch proteolytische Spaltung aktiviert. Aktivierte Caspasen können dann mittels Western Blot detektiert und quantifiziert werden [377, 378]. In SH-SY5Y Zellen wurde so ein großer Anstieg der Caspase-3 Menge nach Behandlung mit A β ₁₋₄₂ ermittelt [370, 379]. Allerdings reflektiert die Menge des Spaltproduktes nicht zwangsläufig die Menge an aktivierten Caspasen. Durch die Anwesenheit von Caspaseinhibitoren wie die E3 Ubiquitin-Proteinligase XIAP weisen nicht alle proteolytisch gespaltenen Procaspasen Aktivität auf [380, 381]. Aus diesem Grund sollten zusätzlich bekannte zelluläre Caspasesubstrate auf Spaltprodukte im Western Blot untersucht werden. Darüber hinaus kann ein absolut gleichmäßiger Proteintransfer aus dem Gel auf die Transfermembran nicht sichergestellt werden, weshalb die Quantifizierung eines Western Blots immer kritisch zu betrachten ist. Aus diesem Grund sollte die Bestimmung der Caspaseaktivität über synthetische Substrate zuverlässigere Ergebnisse liefern. In murinen PC12 Zellen wurde eine A β ₁₋₄₂-vermittelte Caspase-3 Aktivitätssteigerung von mind. 100% gemessen [369, 382]. Tsai et al. [369] verwendeten mit 10 μ M und Li et al. [382] mit 25 μ M hohe A β ₁₋₄₂ Konzentrationen. Nach He et al. [376] werden erst ab einer Konzentration von 10 μ M apoptotische Zellen gefunden. Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass von Li et al. und Tsai et al. hohe Caspase-3 Aktivitäten ermittelt wurden. Allerdings sind die für die Bestimmung der Caspaseaktivität verwendeten synthetischen Substrate nicht 100% spezifisch für eine Caspaseart. Die proteolytische Spaltung kann auch durch mehrere Caspasearten vermittelt werden [383-390]. Darüber hinaus können die synthetischen Substrate sogar von anderen Proteaseklassen wie etwa dem Proteasom gespalten werden [391, 392]. Die Bestimmung der Caspaseaktivität ergibt demzufolge keine spezifische Aktivität, sondern lediglich einen Hinweis auf die Aktivität mehrerer Caspasen, die nicht zwangsläufig zum Zelltod führen muss. Auch beim Caspaseaktivitätstest muss damit gerechnet werden, dass die Ergebnisse durch die Anwesenheit der E3 Ubiquitin-Proteinligase XIAP verfälscht werden.

Caspasen werden noch vor der Externalisierung von Phosphatidylserinen aktiviert. Die Ermittlung der Caspaseaktivität bzw. der Menge aktivierter Caspasen ermöglicht somit Erkenntnisse über das Anfangsstadium der Apoptose. Allerdings werden nicht für jede Art der Apoptoseinduktion Caspasen aktiviert [393, 394]. Die Apoptosedetektion über die Externalisierung von Phosphatidylserinen mittels fluoreszenzmarkiertem Annexin V wird somit als eine verlässlichere Methode angesehen als die Bestimmung der Caspaseaktivität oder der Procaspasespaltung.

5.3.3 A β ₁₋₄₂ generierte oxidativen Stress

Die Aufrechterhaltung der Redox Homöostase (Gleichgewicht zwischen Oxidations- und Reduktionssystemen) ist zwingend erforderlich für eine physiologische Zellfunktion. Um zu überprüfen, ob A β Peptide oxidativen Stress induziert, wurde in der vorliegenden Arbeit die Menge zellulärer Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Form von Wasserstoffperoxid untersucht. Dafür wurden adhärent in 96-wells wachsende Zellen mit dem zellpermeablen 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (H₂DCF-DA) inkubiert und danach mit A β ₁₋₄₂ bzw. A β ₄₂₋₁ behandelt (siehe 4.11). H₂DCF-DA wird intrazellulär durch Esterasen gespalten und in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch Peroxidasen zum fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert [229]. In A β ₁₋₄₂-behandelten Proben wurde eine große Zunahme der intrazellulären ROS Menge im Vergleich zu unbehandelten Proben gefunden (siehe Abb. 55). Für OLN-93 Zellen betrug sie +124,2% und für SH-SY5Y Zellen +176,7%. Der Wert für unbehandelte Proben stellte dabei die unter physiologischen Bedingungen vorhandene ROS Menge dar. Proben, die mit dem Kontrollpeptid A β ₄₂₋₁ behandelt wurden, verhielten sich ähnlich wie unbehandelte Proben. OLN-93 Zellen schienen etwas resistenter gegenüber der A β ₁₋₄₂-vermittelten ROS Generierung zu sein. Im Vergleich zu A β ₁₋₄₂-behandelten SH-SY5Y Proben wurden 19% weniger ROS gebildet.

Interessanterweise wurde durch die selektive Inhibition von Komplex III durch Antimycin A (Positivkontrolle) eine geringere Zunahme der ROS Menge als in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben gemessen. Dies bedeutete, dass durch A β ₁₋₄₂ mehr ROS generiert wurden als durch die Inhibition von Komplex III. Da ROS hauptsächlich an den Komplexen I, III und IV entstehen, wurde vermutet, dass es A β ₁₋₄₂-vermittelte Defizite an diesen Atmungskettenkomplexen gab, durch die ROS generiert wurden. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit sollten sie daher näher untersucht werden.

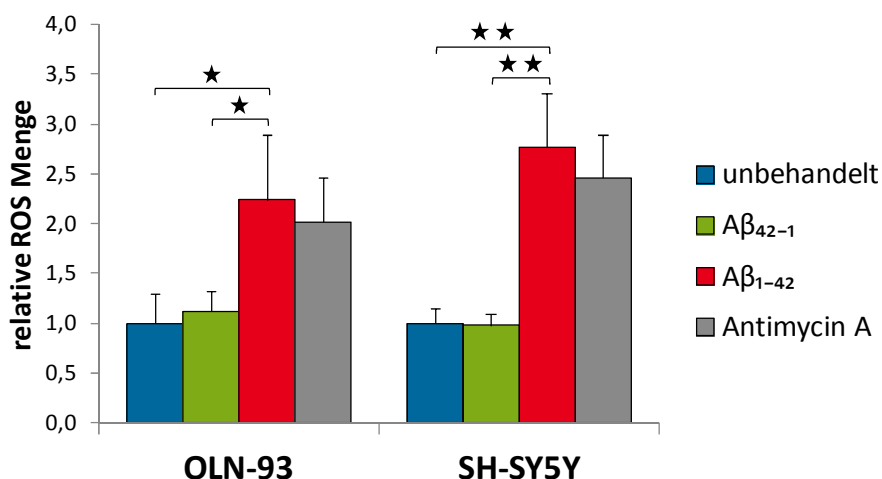


Abb. 55: Stark erhöhte zelluläre ROS Mengen durch A β ₁₋₄₂ in OLN-93 und SH-SY5Y Zellen. Intrazelluläre ROS Mengen wurden durch Wasserstoffperoxid vermittelte Dichlorfluorescein (DCF) Fluoreszenz quantifiziert. Unbehandelte Zellen stellen die unter physiologischen Bedingungen vorhandene ROS Menge dar und wurden deshalb auf 1 gesetzt. Proben, die mit dem Kontrollpeptid A β ₄₂₋₁ inkubiert wurden, verhielten sich ähnlich wie unbehandelte Proben. (N = 4, n = 3, MW \pm Stabw, ★★: $p \leq 0,01$, ★: $p \leq 0,05$)

Die Entstehung von ROS bei der AD Pathogenese ist ein in der Literatur viel diskutiertes Thema. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit viele Forscher von einer Zunahme der ROS Menge durch A β Peptide [359, 361-372, 379, 382, 395-401]. Die exakten Werte schwanken dabei jedoch erheblich. Mastroeni et al. [400] verwendeten mit 2,5 μ M A β ₁₋₄₂ ähnliche Bedingungen wie die in der vorliegenden Arbeit. Sie erhielten mit einer 90%igen ROS Zunahme auch ein vergleichbares Ergebnis, obwohl die Inkubationszeit mit A β ₁₋₄₂ lediglich 12 h betrug (Messung über H₂DCF-DA). Die Inkubationsdauer mit A β Peptiden spielt allerdings eine entscheidende Rolle bei der ROS Generierung. Fu et al. [399] fanden in primären Rattenneuronen, generiert aus Wistar Ratten im embryonalen Stadium E17-19, nach Inkubation mit 2,0 μ M A β ₁₋₄₂ ein Anstieg der ROS Menge um 37% nach 24 h und um 57% nach 72 h (Messung über H₂DCF-DA). Demzufolge ist die A β -induzierte ROS Generierung zeitabhängig. Darüber hinaus ist die entstehende ROS Menge abhängig von der Konzentration an A β ₁₋₄₂ Peptiden. Li et al. fanden für 25 bis 100 μ M A β ₁₋₄₂ einen Anstieg der ROS Menge von 30 auf 150% in murinen PC12 Zellen (bestehen aus einer Mischung von Neuroblasten und eosinophilen Zellen) [382]. Im Vergleich zu Mastroeni et al. [400] oder auch zu den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen ROS Mengen, sind diese Werte vergleichsweise niedrig, dafür dass so hohe Konzentrationen an A β Peptid verwendet wurden. Allerdings wurde mit PC12 eine andere Zelllinie verwendet, die evtl. auf oxidativem Stress anders reagiert als SH-SY5Y Zellen. In der murinen Neuroblastomzelllinie N2a, die stabil mit APP695 bzw. APP_{swe} transfiziert war, wurden 60% bzw. 80% mehr ROS gefunden als in Kontrollzellen (Messung über H₂DCF-DA) [371]. Diese Experimente zeigten, dass A β ₁₋₄₂ spezifisch an der ROS Generierung beteiligt ist, denn in APP_{swe} transfizierten Zellen sollte aufgrund der Schwedischen Mutation im APP Gen eine größere Menge an A β ₁₋₄₂ Peptiden vorhanden sein als in APP695 transfizierten Zellen, was zu dem Unterschied in der gemessenen ROS Menge geführt haben müsste. Sechsmonte alte transgene Mäuse, die eine Schwedische Mutation im APP sowie eine Mutation im Presenilin 1 aufwiesen (APP/PS1 Mäuse), zeigten nur einen 35%igen Anstieg der ROS Menge. Demgegenüber steht allerdings eine 300%ige ROS Zunahme in primären Hirnneuronen, die aus APP/PS1 Mäusen im embryonalen Stadium E15-16 gewonnen wurden [372] (beide Messungen über H₂DCF-DA).

ROS können auch direkt über das an den Atmungskettenkomplexen entstehende Superoxidradikalanion bestimmt werden. Für diesen Nachweis wird Dihydroethidium (DHE) verwendet. Die Reaktion von DHE mit Superoxidradikalanionen resultiert in dem rot fluoreszierenden 2-Hydroxyethidium (2-OH-E(+)), wodurch Anregungs- und Emissionsspektren bathochrom verschoben werden (ex/em DHE: 350/400 nm, 2-OH-E(+): 518/605 nm) [402, 403]. Allerdings ist dieser Farbstoff sehr sauerstoffsensitiv und war unmittelbar nach der Rehydrierung oxidiert. Aus diesem Grund konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Menge von Superoxidradikalanionen nicht bestimmt werden. In der Literatur kommt zum Großteil die ROS Detektion über DCF Fluoreszenz zum Einsatz (siehe vorherigen Absatz). He et al. [359] gehören zu den wenigen Forschern, die DHE für die Ermittlung der ROS Menge verwendeten. In primären kortikalen Neuronen aus Spargue-Dawley Ratten im embryonalen Stadium E17 wurden nach 16-stündiger Behandlung mit 1,0 μ M A β ₁₋₄₂ sehr große ROS Mengen gefunden (1400%ige Erhöhung gegenüber Kontrolle). Dieser Wert ist allerdings

nicht mit den Werten, die über die DCF Fluoreszenz ermittelt wurden, zu vergleichen, weil unterschiedliche Reaktive Sauerstoffspezies gemessen wurden. Keine der beiden Methoden kann die totale ROS Menge widerspiegeln, denn ROS unterliegen einem dauerhaften Konversionsprozess. Zum einen sind sie teilweise nur sehr kurzlebig wie das Hydroxylradikal und zum anderen werden sie durch Enzyme wie die Superoxiddismutase oder die Katalase umgesetzt. Dies erklärt wahrscheinlich auch die teilweise sehr großen Unterschiede in der ermittelten ROS Menge, die in der Literatur beschrieben sind [359, 361-372, 379, 382, 395-401]. Allen gemeinsam ist jedoch, dass in Anwesenheit von A β Peptiden die ROS Menge ansteigt. Aus diesem Grund ist es sinnvoll zu untersuchen, ob die vermehrte Menge an ROS Proteine, Lipide und DNA oxidiert und somit die Zelle nachhaltig schädigt.

Eine indirekte Methode auf die zelluläre ROS Menge zu schließen, besteht in der Analyse von ROS-induzierten Proteinmodifikationen, wie die Bildung von Carbonylgruppen durch Spaltung von Peptidbindungen oder Aminosäureoxidation. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig A β ₁₋₄₂-vermittelte mitochondriale Proteinoxidationen analysiert. Dafür wurden isolierte Mitochondrienproteine mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) inkubiert, wodurch Proteine, die Carbonylgruppen enthielten, zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon derivatisiert wurden und nach Auftrennung in einer SDS-PAGE im sogenannten Oxyblot™ detektiert werden konnten (siehe 4.25). Für beide Zelllinien wurde visuell in A β ₁₋₄₂-behandelten und unbehandelten Proben kein Unterschied in der Menge oxidierten Proteins festgestellt (siehe Abb. 56A, dargestellt ist ein repräsentativer Oxyblot™ für OLM, Daten für SHM nicht gezeigt). Das fehlende Signal in den Proben, die nicht mit DNPH inkubiert wurden, bestätigte die Spezifität des DNP-Antikörpers für DNP-derivatisierte Proteine (eine Ponceau S Färbung der Membran zeigte einen gleichmäßigen Proteintransfer an, siehe 7.8). Die anschließende Quantifizierung mittels der Software ImageJ ergab eine minimale Zunahme oxidierten Proteins in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten Proben (7,0% für OLM und 5,2% für SHM, siehe Abb. 56B). Diese Zunahme war jedoch nicht signifikant. In den Mitochondrien von OLN-93 Zellen waren die Proteine zu 17% weniger carbonyliert als in den Mitochondrien von SH-SY5Y Zellen. Dies könnte zum einen daran liegen, dass es sich bei den SH-SY5Y Zellen um eine Neuroblastomzelllinie handelt. Zum anderen könnten auch ein höheres Niveau an oxidativem Stress oder eine reduzierte Menge zellulärer Antioxidantien bzw. gestörte Mechanismen zur Bekämpfung von schädlichen ROS ursächlich für diesen Unterschied sein.

Generell ist eine Quantifizierung eines Western Blots mit Unsicherheiten behaftet, weil nicht zu 100% sichergestellt werden kann, dass der Transfer für alle Proteine einheitlich über die gesamte Fläche zwischen Gel und Nitrozellulosemembran stattfindet. Dennoch wurde mit dieser Methode ein signifikanter A β ₁₋₄₂-induzierter Anstieg carbonylierter Proteine um ca. 58% in Zelllysaten primärer Neuronen aus dem Ratten-Hippocampus festgestellt (10 μ M A β ₁₋₄₂ für 48 h) [404]. Boyd-Kimball et al. [405] war es sogar möglich spezifische Proteine zu identifizieren, die durch A β ₁₋₄₂ (10 μ M für 6 h) modifiziert wurden, indem sie einen Oxyblot™ nach der Proteinauftrennung mittels 2D-IEF/SDS-PAGE durchführten. In Synapsomen aus 3-Monate alten mongolischen Wüstenrennmäusen fanden sie so eine signifikante Erhöhung der Carbonylierung in *dihydropyrimidinase-related protein-2*, *glial fibrillary acidic*

protein sowie β -Aktin. Für fünf weitere Proteine gab es nicht signifikante Tendenzen hin zu einer vermehrten Carbonylierung. In murinen N2a Zellen transfiziert mit APP695 bzw. APP_{swe} waren Protein zu 28% bzw. 39% mehr carbonyliert [371]. Wie bei den durch $A\beta_{1-42}$ vermehrten ROS Mengen ließ sich vermuten, dass spezifisch $A\beta_{1-42}$ Peptide an der Zunahme der Proteincarbonylierung beteiligt waren. Aufgrund der Tatsache, dass die Proteinoxidation von ROS induziert wird, war diese Vermutung eine logische Konsequenz aus den erhaltenen Ergebnissen.

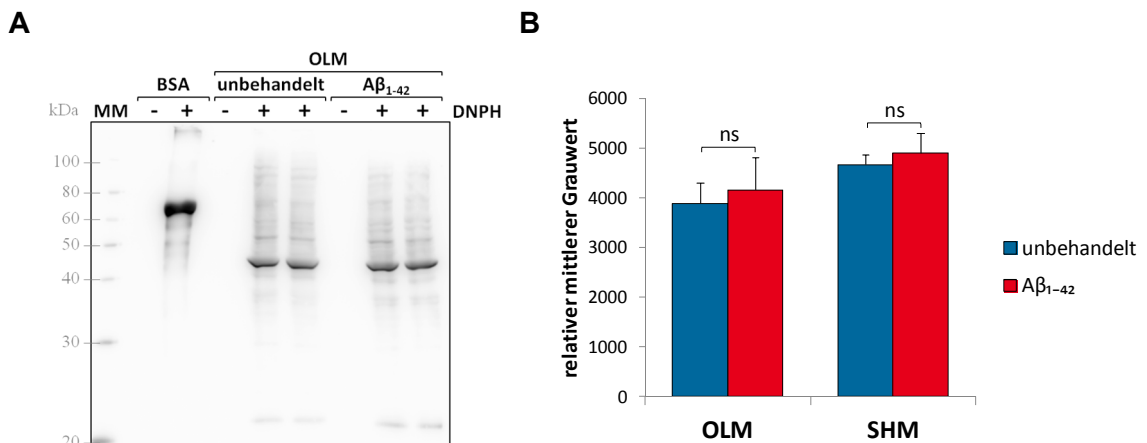


Abb. 56: Nicht signifikante $A\beta_{1-42}$ -induzierte Proteinoxidation. (A) Zellen wurden für 24 h mit $A\beta_{1-42}$ behandelt. In Mitochondrienfraktionen isoliert aus OLN-93 (OLM) und SH-SY5Y (SHM) Zellen wurden anschließend Proteincarbonylgruppen über Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) im OxyBlotTM detektiert (dargestellt ist ein repräsentativer OxyBlotTM). (B) Der mitochondriale Proteincarbonylgehalt wurde mittels ImageJ quantifiziert. (OLM: N = 4, SHM: N = 3, MW \pm Stabw, ns: nicht signifikant)

Qi et al. [406] verwendeten mit 1,0 μ M eine $A\beta_{1-42}$ Konzentration, die ähnlich der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentration ist. Im Vergleich zur Kontrolle ($A\beta_{42-1}$) fanden sie eine ca. 13%ige Zunahme carbonylierter Proteine nach 48-stündiger Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit $A\beta_{1-42}$. Dieser Wert wurde spektrophotometrisch ermittelt und bezieht sich auf Proteinmodifikationen innerhalb der gesamten Zelle. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Werte der Proteinmodifikation geben Proteinmodifikationen von Mitochondrienproteinen wieder und sind damit ein Teil der totalen zellulären Proteincarbonylierung durch $A\beta_{1-42}$. Da ROS hauptsächlich an den Atmungskettenkomplexen entsteht und dadurch oxidativer Stress vornehmlich die Mitochondrien betrifft (siehe 2.5.3), wäre zu erwarten gewesen, dass ein Großteil der carbonylierten Proteine in den Mitochondrien lokalisiert ist. Nach Qi et al. [406] sind in der gesamten Zelle Proteine zu 13% mehr carbonyliert, wenn SH-SY5Y Zellen mit $A\beta_{1-42}$ inkubiert wurden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mitochondriale Proteine durch $A\beta_{1-42}$ zu 5,2% mehr carbonyliert (SH-SY5Y Zellen). Die Erwartungen wurden somit durchaus erfüllt. Vergleichswerte für OLN-93 existieren nicht.

In dem Zusammenhang wäre es noch interessant gewesen, die mitochondrialen Antioxidanzien zu untersuchen. Speziell die mitochondriale Superoxiddismutase (SOD2) spielt eine große Rolle bei der Bekämpfung von ROS (siehe 2.5.3). Eine $A\beta_{1-42}$ -induzierte Ände-

rung der Expression und/oder Aktivität wäre eine mögliche Erklärung für oxidativen Stress. Aus Zeitgründen konnte dieser Ansatz nicht verfolgt werden.

Neben der Bildung von Carbonylgruppen können ebenfalls aus der Analyse der Lipidperoxidation und der oxidativen DNA-Schäden Hinweise auf das zelluläre ROS Level erhalten werden [407]. Victoria Petermann führte im Rahmen ihrer Master Thesis Vorversuche zur Lipidperoxidation in der AG Dencher durch [408]. Es war ihr allerdings nicht möglich eine Methode zu etablieren. Aus zeitlichen Gründen wurde daher die Lipidperoxidation in Abhängigkeit von A β ₁₋₄₂ nicht weiter verfolgt. In der Literatur wurde ein A β ₁₋₄₂ verursachter Anstieg der Lipidperoxidation u.a. für SH-SY5Y Zellen bereits beschrieben [370, 406]. Die Lipidperoxidation kann u.a. über Malondialdehyd (MDA) gemessen werden. MDA entsteht als sekundäres Produkt bei der Lipidperoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Es wird durch seine Reaktion mit Thiobarbitursäure, wodurch ein rot fluoreszierendes Chromogen gebildet wird, bei 532 nm photometrisch nachgewiesen [409, 410]. Qi et al. [406] erhielten so eine 69%ige bzw. 120%ige Zunahme der Lipidoxidation nach der Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit 1,0 μ M bzw. 10 μ M A β ₁₋₄₂ für 48 h. Guo et al. [370] ermittelten vergleichbare Resultate durch die Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit 10 μ M A β ₁₋₄₂ für 48 h. In den murinen Neuroblastomzellen N2a, die stabil APP695 bzw. APP_{swe} exprimierten, wurden mit einem Lipidperoxidationsanstieg um 81 bzw. 112% ebenfalls vergleichbare Ergebnisse zur Behandlung mit 1,0 bzw. 10 μ M A β ₁₋₄₂ erzielt [371]. Somit ist die Lipidperoxidation wie auch die generierte ROS Menge und die Proteinoxidation spezifisch von A β ₁₋₄₂ Peptiden abhängig. A β ₁₋₄₂-induzierte Schäden der mitochondrialen DNA wurden ebenfalls schon veröffentlicht [411, 412]. Eingehende Untersuchung zu den mitochondrialen DNA-Schäden werden derzeit von meiner Kollegin Tamara Dzinic im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt und werden deshalb an dieser Stelle nicht weiter diskutiert.

5.3.4 A β ₁₋₄₂ beeinträchtigte den mitochondrialen Energiestoffwechsel

Hansson Petersen et al. [151] analysierten die intramitochondriale Lokalisation von extern applizierten A β ₁₋₄₂ Peptiden in Rattenlebermitochondrien. Nach 30-minütiger Inkubation der Mitochondrien mit 100 nM A β ₁₋₄₂ detektierten sie das Peptid in der IMM Fraktion. Zusätzliche Studien an Rattenlebermitochondrien und humanen Hirnbiopsieproben zeigten, dass ein Großteil (~75%) des A β ₁₋₄₂ Peptids an den Cristae der IMM lokalisiert war. Demzufolge ist eine Wechselwirkung von A β Peptiden und der IMM nicht auszuschließen. Da der Proteinanteil in der IMM im Vergleich zum Lipidanteil sehr hoch ist (80:20, w/w), lässt sich vermuten, dass A β Peptide die Membranproteine der IMM beeinflussen. Aus diesem Grund wurden die Atmungskettenkomplexe näher analysiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine starke Erhöhung der ROS Menge in Anwesenheit von A β ₁₋₄₂ ermittelt (siehe Abb. 55). Um Hinweise darüber zu erhalten, ob ROS durch A β ₁₋₄₂ induziert wird oder durch eine fehlerhafte Funktion der Atmungskette, wurden Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe sowie die zelluläre ATP Menge in Abhängigkeit von A β ₁₋₄₂ untersucht.

In-Gel Aktivitätstest

Da die Atmungskettenkomplexe nicht nur als individuelle Komplexe vorkommen, sondern auch als Homooligomere und Superkomplexe [140, 141] (siehe 2.5.1), sollte die Aktivität eines jeden Assemblierungszustandes des jeweiligen Komplexes einzeln ermittelt werden. Dafür wurden pro Probe (unbehandelt, A β ₁₋₄₂-behandelt) 120 μ g Mitochondrienproteine mittels BN-PAGE aufgetrennt und in einer Aktivitätstestlösung spezifisch für Komplex I bzw. Komplex IV inkubiert (siehe 4.22.1.1). Proteinbanden im nativen Gel, die die aktive Untereinheit des jeweiligen OxPhos Komplexes enthielten, färbten sich mit zunehmender Inkubationszeit an. Die quantitative Analyse erfolgte anhand densitometrischer Verfolgung dieser Farbzunahme in Intervallen von 5 min.

Beim in-Gel CIV Aktivitätstest resultiert die Oxidation von Cyt c durch die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (MTCO1) in der gleichzeitigen Oxidation und Polymerisation von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Dadurch fällt in CIV enthaltenen Proteinbanden ein braunes Präzipitat aus (siehe Abb. 26) [270]. Für BHM wurden so gefärbte Proteinbanden für den individuellen Komplex IV (IV₁), das Homodimer (IV₂) und Homotrimer (IV₃) sowie für die Superkomplexe III₂IV₁, III₂IV₂, I₁IV₂ und I₁III₂IV₁₋₃ erhalten (siehe Abb. 57A+D und 7.9 B). Im Vergleich zu BHM waren die Intensitäten der Präzipitatbildung für beide Zelllinien schwach und nur schwierig vom hohen Hintergrundsignal zu unterscheiden, obwohl die 4-fache Menge an Protein verwendet wurde. Darüber hinaus waren die einzelnen Proteinbanden speziell im Superkomplexbereich nur schwer voneinander zu trennen. Dies erschwerte die quantitative Auswertung. Selbst im Fusionsgel (siehe Abb. 57B+E), das eine exakte Überlagerung jeder einzelnen densitometrischen Aufnahme darstellt, konnte nicht zwischen den Superkomplexen I₁III₂IV₁, I₁III₂IV₂ und I₁III₂IV₃ unterschieden werden, weshalb sie für die Auswertung als eine Proteinbande markiert wurden. In beiden Zelllinien wurden darüber hinaus Proteinbanden für IV₁, IV₂ und IV₃ gefunden. Für OLM konnte zusätzlich III₂IV₁ als Überlagerung mit V₁ markiert werden. Die Quantifizierung erfolgte als absolutes Grauwertpixelvolumen V unter Berücksichtigung des Hintergrundsignals, der relativen Proteinmenge und des Molmassenanteils von Komplex IV am jeweiligen Superkomplex. Alle Werte wurden zudem auf die Kopienzahl 1 normiert um sie untereinander besser vergleichen zu können. Durch die Auftragung der erhaltenen Werte für die Präzipitatzunahme einer jeden Bande gegen die Zeit wurde aus der Steigung des linearen Bereichs die relative spezifische Aktivität in Graueinheiten pro Minute erhalten (Details zur Quantifizierung siehe 4.22.1.1).

Für OLM wurde eine nicht signifikante Zunahme der Aktivitäten für I₁III₂IV₁₋₃ (+53,5%), III₂IV₁ (+9,9%) und IV₂ (+40,9%) in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten ermittelt (siehe Abb. 57C). Die Aktivitäten von IV₁ und IV₃ verringerten sich geringfügig (-2,7% bzw. -3,1%). Die höchste relative spezifische Aktivität wurde für den individuellen Komplex IV in unbehandelten und A β ₁₋₄₂-behandelten Proben erhalten und die geringste für das Homotrimer. Von IV₁ über IV₂ bis zu IV₃ verringerte sich die Aktivität und stieg in den Superkomplexen wieder an. Auffällig waren die großen Fehlerbalken (mit Ausnahme von IV₃). Im Vergleich zu BHM waren die erhaltenen CIV Aktivitäten gegensätzlich (siehe Abb. 27). Die relativen spezifischen CIV Aktivitäten waren im Superkomplexbereich um ca. das 10-fache geringer, jedoch etwas höher für IV₁. Mit Ausnahme der Superkomplexe

I₁III₂IV₁₋₃, für die ein höherer Aktivitätswert ermittelt wurde, waren die relativen spezifischen Aktivitäten für SHM im gleichen Bereich wie die für OLM (siehe Abb. 57F). In A β ₁₋₄₂-behandelten Proben wurde für I₁III₂IV₁₋₃, IV₃ und IV₁ eine nicht signifikante Abnahme der CIV Aktivität für SHM erhalten (-13,4%, -15,0% bzw. -2,7%). Die Aktivität von IV₂ erhöhte sich in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben leicht (+2,6%). Im Gegensatz zu OLM wiesen die Superkomplexe I₁III₂IV₁₋₃ die größte Aktivität auf. IV₃ zeigte auch für SHM die geringste CIV Aktivität. Auffällig waren hier große Fehlerbalken für IV₁.

BN Western Blots hatten bereits gezeigt, dass Zellkulturproben im Vergleich zu BHM geringere Intensitäten der Proteinbanden trotz größerer Proteinmenge aufweisen (siehe 5.2.2). Die geringeren Intensitäten in der Bandenfärbung bei den in-Gel CIV Aktivitätstests waren deshalb nicht verwunderlich. Das hohe Hintergrundsignal, das wahrscheinlich durch die große Proteinmenge, die auf jede Spur geladen wurde, hervorgerufen wurde, stellte ein Problem bei der Auswertung dar. Die geringen Bandenintensitäten in Kombination mit einem hohen Hintergrundsignal erschwerten eine exakte Bandenmarkierung. Trotz mehrmaliger Optimierung des D/P Verhältnisses war es für den in-Gel CIV Aktivitätstest nicht möglich zwischen den Superkomplexen I₁III₂IV₁, I₁III₂IV₂ und I₁III₂IV₃ zu unterscheiden, weshalb sie für die Auswertung zu einer Bande zusammengefasst werden mussten. Aus dieser Zusammenfassung ergaben sich Ungenauigkeiten in der Auswertung und der eigentliche Zweck des in-Gel Aktivitätstests, CIV Aktivitäten innerhalb verschiedener Assemblierungszustände einzeln zu ermitteln, wurde weitestgehend nicht erreicht. Darüber hinaus waren die erhaltenen Werte für die relativen spezifischen CIV Aktivitäten für III₂IV₁ in OLM Proben kritisch zu betrachten, weil es sich bei der markierten Proteinbande um eine Überlagerung von III₂IV₁ mit V₁ handelte. Das absolute Grauwertpixelvolumen V beinhaltet somit auch einen Anteil für V₁, weshalb die Werte für die relativen spezifischen Aktivitäten wahrscheinlich zu gering ausgefallen sind.

Die Ergebnisse der in-Gel CIV Aktivitätstest für unbehandelte Proben stehen im Widerspruch zu denen, die für den filamentösen Pilz *Podospira anserina* [413] sowie für Rattenherz [414] und -gehirn [311, 415] erhalten wurden. In all diesen Proben war die spezifische Aktivität des individuellen Komplex IV um ein Vielfaches geringer als die der Superkomplexe I₁III₂IV₁₋₃. Aufgrund der vielen Unsicherheiten des in-Gel CIV Aktivitätstest bei der Analyse von Zellkulturproben wird an dieser Stelle auf eine ausführliche Diskussion verzichtet.

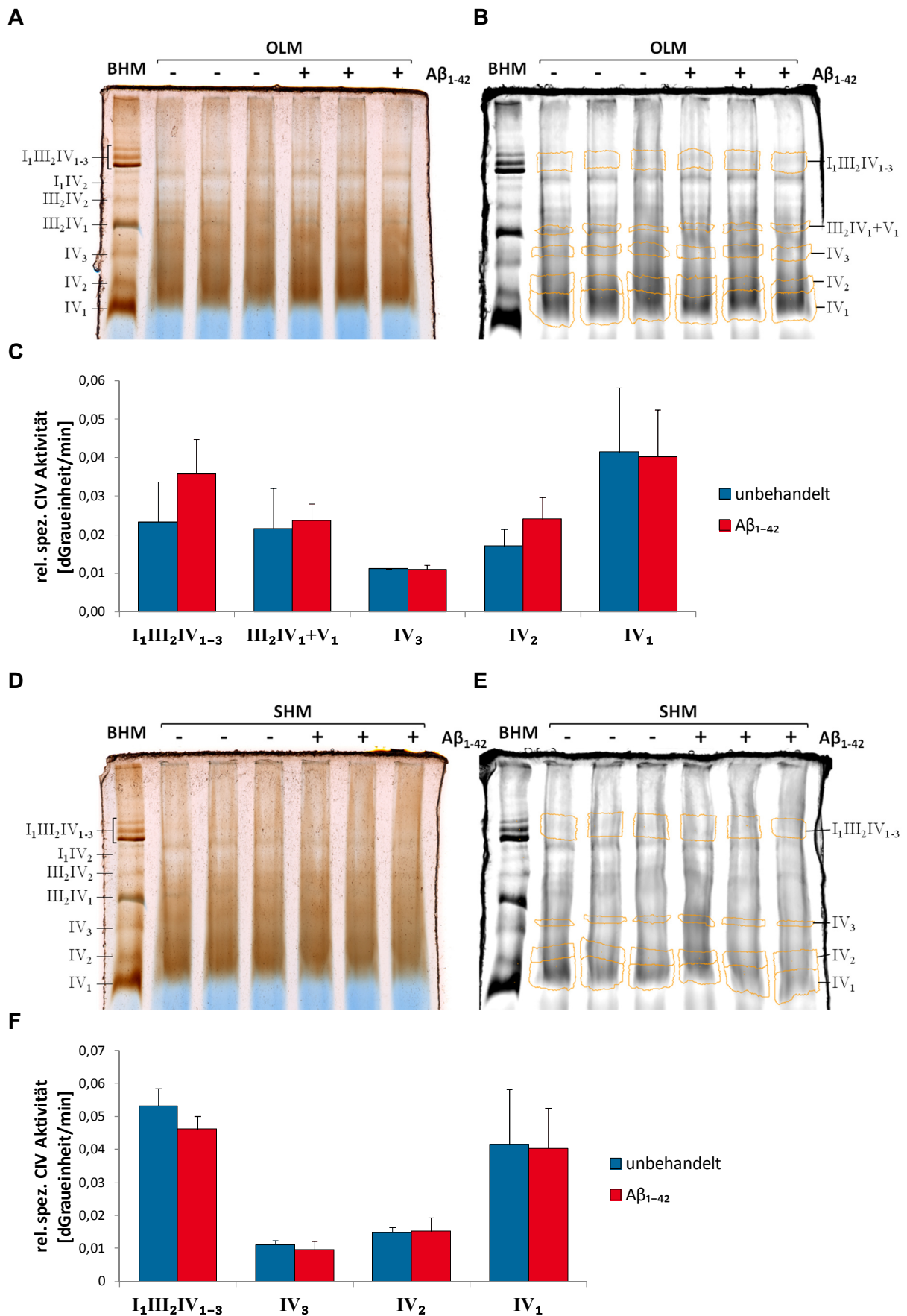


Abb. 57: Keine signifikanten Änderungen der Cytochrom c Oxidase Aktivität durch $A\beta_{1-42}$ Behandlung in in-Gel CIV Aktivitätstests. (A+D) 120 μ g Mitochondrienproteine (D/P:

3,0 g/g) wurden pro Probe in einer BN-PAGE aufgetrennt und ein quantitativer in-Gel CIV Aktivitätstest bei 24,3°C durchgeführt. Dargestellt ist das BN-Gel nach 180-minütiger Inkubation in Aktivitätstestlösung. Es bildete sich ein braunes Präzipitat in allen CIV enthaltenen Proteinbanden. (B+E) Fusionsgel, resultierend aus allen densitometrischen Aufnahmen, mit Bandenmarkierungen für CIV Aktivität. (C+F) Relativ spezifische CIV Aktivität normiert auf die Kopienzahl 1 (N = 3, MW ± Stabw, nicht signifikant). (C) Für OLM wurde nach A β ₁₋₄₂ Inkubation eine nicht signifikante Zunahme der Aktivitäten für I₁III₂IV₁₋₃, III₂IV₁ und IV₂ sowie eine nicht signifikante Abnahme der Aktivitäten für IV₁ und IV₃ ermittelt. (F) I₁III₂IV₁₋₃, IV₃ und IV₁ Aktivitäten sanken für A β ₁₋₄₂-behandelte SHM nicht signifikant und die Aktivität von IV₂ erhöhte sich leicht.

Obwohl die in-Gel CIV Aktivitätstests keine hinreichenden Ergebnisse geliefert hatten, wurde ein in-Gel CI Aktivitätstest durchgeführt. Es war bekannt, dass das Hintergrundsignal geringer sein würde, wodurch weniger Komplikationen bei der Ermittlung der relativen spezifischen CI Aktivitäten erwartet wurden.

Beim in-Gel CI Aktivitätstest färbten sich Proteinbanden lila, wenn NADH-Dehydrogenase Aktivität (aktive CI Untereinheit) vorhanden war (siehe Abb. 58A+D und 7.9 A). Diese Färbung wurde durch die NADH-Dehydrogenase vermittelte Reduktion von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zu Di-Formazan hervorgerufen, das als lila Präzipitat ausfiel (siehe Abb. 25) [269, 270]. Für BHM wurden so gefärbte Proteinbanden für den individuellen Komplex I (I₁) sowie für die Superkomplexe I₁IV₂ und I₁III₂IV₀₋₃ erhalten. Wie für den in-Gel CIV Aktivitätstest waren die Intensitäten der Präzipitatbildung für beide Zelllinien im Vergleich zu BHM sehr schwach und im Superkomplexbereich waren die einzelnen Proteinbanden nur schwer voneinander zu trennen. Im Gegensatz zum in-Gel CIV Aktivitätstest konnte beim in-Gel CI Aktivitätstest im Superkomplexbereich zwischen I₁III₂, I₁III₂IV₁ und I₁III₂IV₂₋₃ unterschieden werden (siehe Fusionsgel in Abb. 58B+E). Die Superkomplexe I₁III₂IV₂ und I₁III₂IV₃ wurden für die Auswertung als eine Proteinbande markiert. Darüber hinaus wurde für beide Zelllinien der Superkomplex I₁IV₂ nicht gefunden. SHM zeigten außerdem keine Präzipitatbildung für den Superkomplex I₁III₂. Die Quantifizierung erfolgte analog zu der vom in-Gel CIV Aktivitätstest (siehe weiter oben).

Alle Proben zeigten die höchsten Aktivitäten in den Superkomplexen I₁III₂IV₁ und I₁III₂IV₂₋₃ (siehe Abb. 58C+E). In unbehandelten OLM Proben waren die Superkomplexe I₁III₂IV₁ und I₁III₂IV₂₋₃ im Rahmen der Fehlertoleranz ungefähr gleich aktiv, wohingegen in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben I₁III₂IV₁ die größte enzymatische Aktivität aufzuweisen schien (siehe Abb. 58C). Superkomplex I₁III₂ und der individuelle Komplex I waren in unbehandelten OLM Proben ebenfalls gleich aktiv, aber sehr viel weniger aktiv als I₁III₂IV₁ und I₁III₂IV₂₋₃ (ca. -66%). In A β ₁₋₄₂-behandelten Proben zeigte I₁ die geringste Aktivität (-78% im Vergleich zu I₁III₂IV₁). Im Vergleich zu unbehandelten OLM Proben wurde eine nicht signifikante Zunahme der I₁III₂IV₁ Aktivität (+22,2%) sowie eine nicht signifikante Abnahme der Aktivität des individuellen Komplex I (-19,1%) in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben gefunden. Die Aktivitäten der Superkomplexe I₁III₂IV₂₋₃ und I₁III₂ wurde nur im geringen Maß von A β ₁₋₄₂ negativ beeinflusst (-2,3% bzw. -5,3%). Die totale CI Aktivität, die sich aus der Summe der CIV Aktivitäten für jeden Assemblierungszustand von Komplex IV ergab, verringerte sich durch A β ₁₋₄₂ kaum (-4,5%). Für Komplex V wurde wie erwartet so gut wie keine Aktivität nachgewiesen. Auffällig waren die teils sehr großen Fehlerbalken (besonders für die

Superkomplexe $I_1III_2IV_1$ und $I_1III_2IV_{2-3}$). Im Vergleich zu BHM (siehe Abb. 27) waren die relativen spezifischen CI Aktivitäten um ca. das 10-fache geringer.

Für SHM wurde sowohl in unbehandelten als auch $A\beta_{1-42}$ -behandelten Proben die größte Aktivität im Superkomplex $I_1III_2IV_1$ gefunden und die geringste im individuellen Komplex I (siehe Abb. 58F). Im Vergleich zu OLM wurde für SHM eine kleinere Aktivitätsabnahme zwischen den Superkomplexen $I_1III_2IV_1$ und $I_1III_2IV_{2-3}$ und dem individuellen Komplex IV in unbehandelten Proben gefunden (-49 bzw. -37%), was jedoch dem großen Fehler für die Aktivitätsbestimmung im Superkomplexbereich zuzuschreiben sein dürfte. Für SHM wurden im Superkomplexbereich noch geringere Werte für die relativen spezifischen Aktivitäten erhalten als für OLM. Sowohl für I_1 als auch für die Superkomplexe $I_1III_2IV_1$ und $I_1III_2IV_{2-3}$ wurde eine nicht signifikante Zunahme der relativen spezifischen CI Aktivität für $A\beta_{1-42}$ -behandelte Proben gefunden (+28,8%, +73,2% und +83,0%). Auffällig waren auch hier große Fehlerbalken (besonders für die Superkomplexe der unbehandelten Proben). I_1 in SHM und OLM hatte ungefähr die gleiche relative spezifische Aktivität, wohingegen die relativen spezifischen Aktivitäten der Superkomplexe in OLM größer waren als die in SHM.

Trotz der Ungenauigkeiten, die auch für den in-Gel CI Aktivitätstest auftraten, waren die erhaltenen Ergebnisse für unbehandelte Proben im Einklang mit in-Gel CI Aktivitätstest, die mit Mitochondrien isoliert aus *Podospora anserina* [413], Rattenherz [414] und -gehirn [311, 415] durchgeführt wurden. In allen Fällen waren die Komplex IV Aktivitäten im Superkomplexbereich $I_1III_2IV_{1-3}$ höher als im individuellen Komplex IV.

Auch wenn die Bandenintensitäten für die in-Gel Aktivitätstests sehr schwach waren, führte die Optimierung des D/P Verhältnisse zumindest für den in-Gel CI Aktivitätstest dazu, dass im Superkomplexbereich zwischen I_1III_2 , $I_1III_2IV_1$ und $I_1III_2IV_{2-3}$ unterschieden werden konnte. Die densitometrisch erfassten Intensitäten waren jedoch besonders für den in-Gel CIV Aktivitätstest nicht sehr viel größer als das Hintergrundsignal, was zu Ungenauigkeiten in der Auswertung geführt haben kann und auch der wahrscheinlichste Grund für die teils großen Fehlerbalken ist. Speziell für SHM entstand so der Eindruck, als würde die relative spezifische Aktivität der Superkomplexe durch $A\beta_{1-42}$ sehr deutlich gesteigert. Die ermittelten Werte der relativen spezifischen Aktivitäten waren ca. um das 10-fache geringer als die für BHM (siehe Abb. 27), weshalb hier die Frage aufgeworfen wird, inwiefern es überhaupt sinnvoll ist, einen in-Gel Aktivitätstest mit OLM und SHM durchzuführen. Darüber hinaus existieren in der Literatur keine Vergleichswerte zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten in-Gel Aktivitätstests mit isolierten Mitochondrien aus unbehandelten und $A\beta_{1-42}$ -behandelten OLN-93 bzw. SH-SY5Y Zellen. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Ergebnisse mit anderen Tests verifiziert.

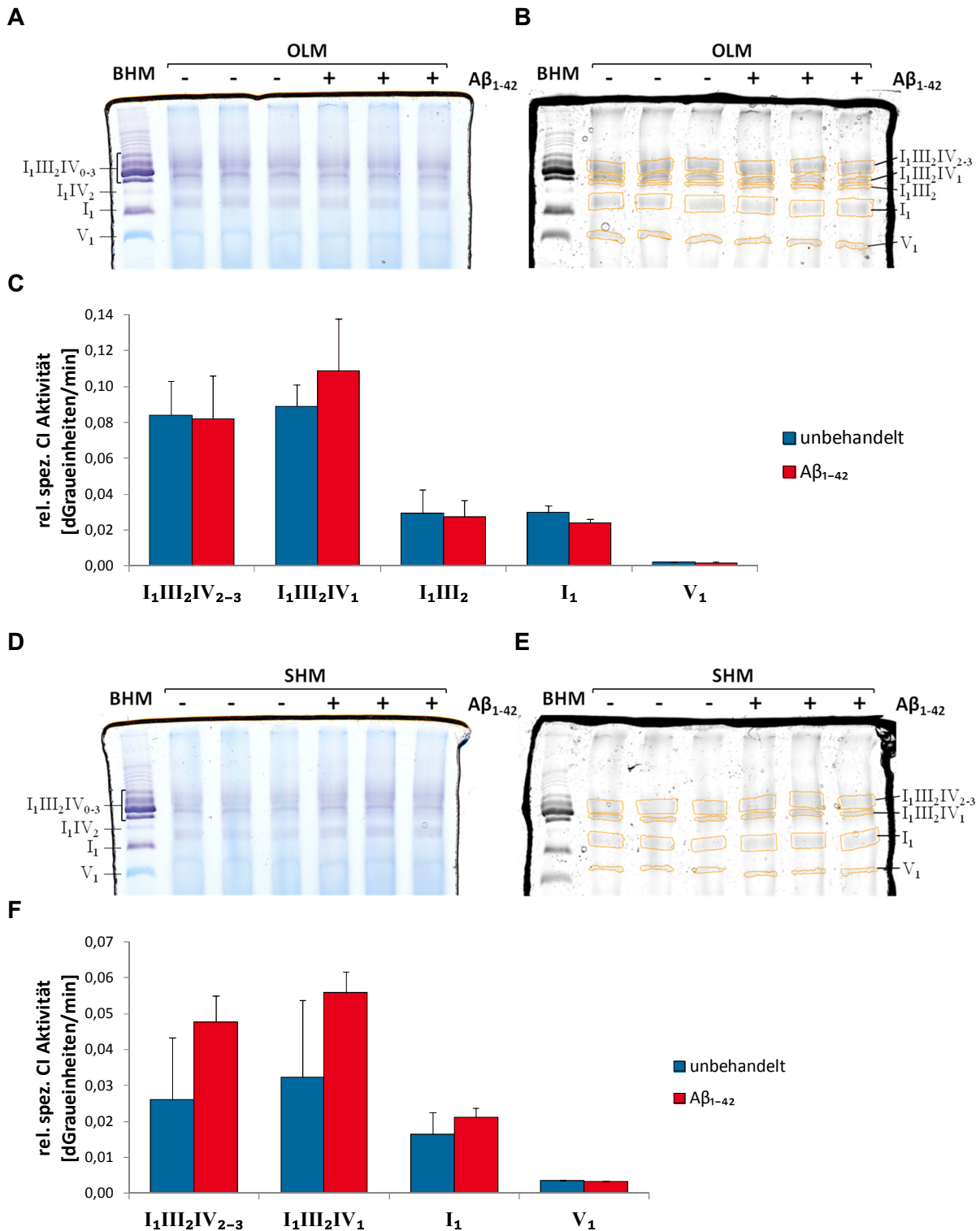


Abb. 58: Keine signifikanten Änderungen der NADH Dehydrogenase Aktivität durch $A\beta_{1-42}$ Behandlung in in-Gel CI Aktivitätstests. (A+D) 120 μ g Mitochondrienproteine (D/P: 3,0 g/g) wurden pro Probe in einer BN-PAGE aufgetrennt und ein quantitativer in-Gel CI Aktivitätstest bei 25,7°C durchgeführt. Dargestellt ist das BN-Gel nach 180-minütiger Inkubation in Aktivitätstestlösung. Es bildete sich ein lila Präzipitat in allen CI enthaltenen Proteinbanden. (B+E) Fusionsgel, resultierend aus allen densitometrischen Aufnahmen, mit Bandenmarkierungen für CI Aktivität. (C+F) Relativ spezifische CI Aktivität normiert auf die Kopienzahl 1 (N = 3, MW \pm Stabw, nicht signifikant). (C) Für OLM wurde eine nicht signifikante Zunahme der $I_1 III_2 IV_1$ Aktivität sowie eine nicht signifikante Abnahme der I_1 Aktivität

ermittelt. I₁III₂IV₂₋₃ und I₁III₂ zeigten nur minimal verringerte Aktivitäten. (F) I₁ und I₁III₂IV₁₋₃ Aktivitäten stiegen für SHM nicht signifikant an.

Aktivitätstest mit immobilisiertem OxPhos Komplex I

In-Gel Aktivitätstest stellen die einzige Möglichkeit dar, Aktivitäten von Atmungskettenkomplexen innerhalb ihrer verschiedenen Assemblierungszustände (individueller Komplex, Superkomplex) zu ermitteln. Alternative Tests können demzufolge nur die totale Aktivität eines Atmungskettenkomplexes messen.

Für die Ermittlung der totalen CI Aktivität wurden daher 40-80 µg frisch isolierte Mitochondrienproteine solubilisiert und Komplex I in einer Mikrotiterplatte mittels Fängerantikörper immobilisiert (siehe 4.22.3). Wie beim in-Gel Aktivitätstest wird durch CI Aktivität ein Tetrazoliumsalz zu Di-Formazan umgesetzt, dessen Bildung als Absorptionsänderung bei 450 nm über die Zeit verfolgt werden kann. Für OLM wurde so ein nicht signifikanter Anstieg der spezifischen CI Aktivität in Aβ₁₋₄₂-behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten gefunden (+6,4%, siehe Abb. 59), der im Rahmen der Fehlertoleranz nicht als Anstieg bewertet werden konnte. Im Gegensatz dazu führte Aβ₁₋₄₂ in SHM zu einer schwach signifikanten Verringerung der spezifischen CI Aktivität (-11,1%). OLM Proben wiesen eine höhere spezifischen CI Aktivität als SHM Proben auf.

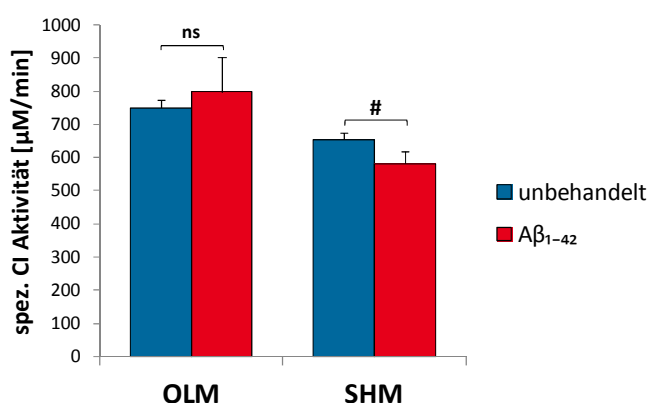


Abb. 59: Geringe Änderungen der NADH Dehydrogenase Aktivität durch Aβ₁₋₄₂ Behandlung in Aktivitätstests mit immobilisiertem Komplex I. Nach Solubilisierung von Mitochondrienproteinen wurde Komplex I durch spezifische Fängerantikörper in einer Mikrotiterplatte immobilisiert. CI Aktivität wurde durch die Reduktion von NBT zu Di-Formazan bei 450 nm verfolgt (22,0°C). Aβ₁₋₄₂-behandelte Proben zeigten einen nicht signifikanten Anstieg der CI Aktivität für OLM und eine schwach signifikante Verringerung für SHM im Vergleich zu unbehandelten Proben. (N = 3, n = 3, MW ± Stabw, #: p ≤ 0,1, ns: nicht signifikant)

Die totale CI Aktivität, die sich aus der Summe der Aktivitäten aller Assemblierungszustände im in-Gel CI Aktivitätstest ergibt, ließ für Aβ₁₋₄₂-behandelte OLM Proben eine abnehmende und für Aβ₁₋₄₂-behandelte SHM Proben eine zunehmende Tendenz vermuten (siehe Abb. 58). Es wurden jedoch durch den Aktivitätstest mit immobilisiertem Komplex I genau gegensätzliche Tendenzen für die totale CI Aktivität erhalten.

Beide Methoden weisen Nachteile auf, die für eine Einschätzung der CI Aktivität gegeneinander abzuwägen sind. Beim Aktivitätstest mit immobilisiertem Komplex I wurde für die

Solubilisierung ein Detergensgemisch aus Dodecyl- β -D-Maltosid und Laurylmaltosid verwendet. Diese Mischung dürfte weniger mild sein als Digitonin (vergleiche hierzu Krause und Seelert [253]). Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die Solubilisierung wahrscheinlich mit höherer Effizienz erreicht wurde, dafür aber ein Teil der nativen Assemblierungen zerstört wurden, was im Zerfall von Superkomplexen und der damit verbundenen Aktivitätsminderung resultierte. Darüber hinaus ist es fraglich, ob Superkomplexe an den Fängerantikörper binden können. Die Assemblierung zu Superkomplexen könnte evtl. das Epitop, das vom Fängerantikörper erkannt wird, am Komplex I unzugänglich machen. Dadurch würden nur individuelle Komplex I Aktivitäten gemessen. Gegen diese Annahme spricht allerdings, dass beim in-Gel Aktivitätstest für den individuellen Komplex I genau gegensätzliche Aktivitätsunterschiede (Tendenzen) durch A β_{1-42} im Vergleich zum Aktivitätstest mit immobilisiertem Komplex I erhalten wurden. Im Gegensatz zum Aktivitätstest mit immobilisiertem Komplex I wurden die Mitochondrienproteine beim in-Gel CI Aktivitätstest mit Digitonin solubilisiert. Alle Assemblierungen zu Superkomplexen sollten daher erhalten sein. Allerdings sind die Mitochondrienproteine bei diesem Test in einer Gelmatrix immobilisiert, die sich störend auf die Aktivitätsbestimmung auswirken kann. Die Proteine sind in Banden komprimiert, was die Zugänglichkeit der für den Test benötigten Cofaktoren beschränken kann. Beiden Tests gemeinsam ist die Bestimmung der CI Aktivität außerhalb der physiologischen Umgebung des Proteins, denn durch die Solubilisierung wurden die Atmungskettenkomplexe aus der Lipiddoppelschicht herausgelöst. Um CI Aktivitäten unter physiologischeren Bedingungen zu bestimmen, wurden deshalb Messungen an Mitochondrien in einem sogenannten in-Lösung Ansatz vorgenommen.

In-Lösung Aktivitätstests

Der in-Lösung CI Aktivitätstest misst die Aktivität von Komplex I im Gegensatz zu den vorherigen Aktivitätstest auf direktem Weg durch die photometrisch verfolgbare Abnahme von NADH+H⁺, das durch Komplex I Aktivität zu NAD⁺ oxidiert wird. Dafür wurden die Membranen von frisch isolierten Mitochondrien durch Einfrier-und-Auftau-Zyklen transient aufgebrochen, um die Zugänglichkeit der benötigten Cofaktoren (NADH+H⁺ und Decylubichinon) zu erhöhen. In einer Küvette wurden die Mitochondrien mit CI Reaktionspuffer, der die Cofaktoren enthielt, gemischt und die Abnahme von NADH+H⁺ bei 340 nm verfolgt (siehe 4.22.2). Diese Absorptionsabnahme wurde für 150 s verfolgt (repräsentative Messungen sind in Kapitel 7.9 C aufgeführt). Aus der Steigung des linearen Bereichs errechnete sich die Enzymaktivität. Da NADH+H⁺ auch an anderen Stellen des Stoffwechsels oxidiert wird, musste die Spezifität der CI Aktivität durch eine zusätzliche Messung mit dem spezifischem CI Inhibitor Rotenon sichergestellt werden, denn nur die rotenonsensitive Aktivität lässt sich auf die Oxidation von NADH+H⁺ durch Komplex I zurückführen (siehe Abb. 60A). Für eine spezifische Messung musste die Inhibition mind. 65% betragen [237]. Die spezifische CI Aktivität wurde dann durch Subtraktion der rotenonsensitiven Aktivität von der CI Aktivität erhalten.

Für beide Zelllinien wurde eine Reduktion der spezifischen CI Aktivität in A β_{1-42} -behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten ermittelt (-33,0% für OLM, schwach signifikant und

-20,5% für SHM, hochsignifikant). Die spezifische CI Aktivität für unbehandelte OLM Proben war nur geringfügig höher als die für unbehandelte SHM Proben (siehe Abb. 60B).

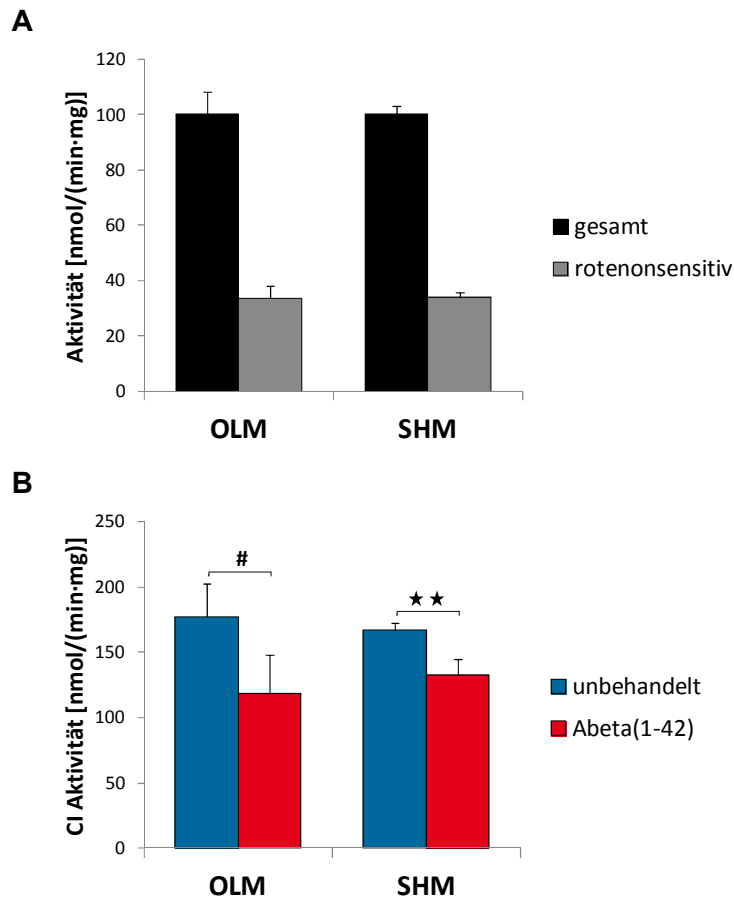


Abb. 60: Aβ₁₋₄₂-vermittelte Abnahme der Aktivität von Komplex I. Für den in-Lösung CI Aktivitätstest wurde die CI katalysierte Oxidation von NADH⁺+H⁺ bei 340 nm und 37°C in isolierten Mitochondrien verfolgt. (A) Bei einer Inhibition von mind. 65% war die Aktivitätsmessung als spezifisch anzusehen. (B) Durch die Subtraktion der rotenonsensitiven Aktivität von der Gesamtaktivität wurde die spezifische CI Aktivität erhalten. Aβ₁₋₄₂ verursachte in beiden Zelllinien eine Reduktion der spezifischen CI Aktivität. (N=4, MW ± Stabw, ★★: p≤0,01, #: p≤0,1)

Im Vergleich zum in-Gel CI Aktivitätstest (siehe Abb. 58) und dem Aktivitätstest mit immobilisiertem Komplex I (siehe Abb. 59) schien Aβ₁₋₄₂ einen deutlichen negativen Einfluss auf die CI Aktivität von OLM zu haben. Da in der Literatur keine Vergleichswerte zu CI Aktivitäten existieren, müssen die Methoden weiter für die Verwendung von Oligodendrozyten optimiert werden, um genaue Aussagen über das Ausmaß des Einflusses von Aβ₁₋₄₂ Peptiden auf OLM zu machen. An dieser Stelle kann lediglich festgehalten werden, dass Aβ₁₋₄₂ die CI Aktivität in OLM nicht vollständig hemmt.

In-Gel CI Aktivitätstests mit SHM ließen zwar vermuten, dass die CI Aktivität durch Aβ₁₋₄₂ zunimmt (siehe Abb. 58), aber aufgrund des großen Fehlers besonders für unbehandelte Proben und der fehlenden Signifikanzen waren diese Werte sehr kritisch zu betrachten. Sowohl für den Aktivitätstest mit immobilisiertem Komplex I (siehe Abb. 59) als auch für den in-Lösung CI Aktivitätstest (siehe Abb. 64) wurden signifikante Abnahmen der CI

Aktivität in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben gefunden. Die Einbettung des Komplex I in seine Membran schien dabei tatsächlich eine Rolle zu spielen, denn der A β ₁₋₄₂ Einfluss war im in-Lösung Ansatz (-20,5%) größer als im Test mit immobilisiertem CI (-11,1%).

In primären Granularzellen des Cerebellums (Kleinhirn) von 7-Tagen alten Wistar Ratten wurde nach Behandlung mit 2,0 μ M A β ₁₋₄₂ in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit ein A β ₁₋₄₂-induzierter Rückgang der CI Aktivität gemessen [416] und isolierte Mitochondrien aus Gehirnen von Wistar Ratten, die mit 20 μ M A β ₁₋₄₂ für 20 min inkubiert wurden, zeigten eine 10%ige geringere CI Aktivität [417]. In Mitochondrien aus Hirnbiopsien von Alzheimerpatienten wurde ebenfalls eine verringerte CI Aktivität gefunden [418]. Allerdings wurden in SH-SY5Y Zellen, die stabil mit APP695 transfiziert waren, keine Unterschiede in der CI Aktivität im Vergleich zu Kontrollzellen gefunden [419]. Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn nicht-synaptische Hirnmitochondrien aus adulten Wistar Ratten mit hohen Konzentrationen (50 μ M bzw. 100 μ M) an A β ₂₅₋₃₅ behandelt wurden [420, 421]. Dies spricht dafür, dass die Komplex I Aktivität spezifisch von A β ₁₋₄₂ Peptiden negativ beeinflusst wird. APP überexprimierende Zellen generieren hauptsächlich A β ₁₋₄₀ [30] und die 10% entstehendes A β ₁₋₄₂ [38] scheinen im *in vitro* Versuch nicht ausreichend um sich auf die CI Aktivität auszuwirken. Interessanterweise änderte sich die CI Aktivität in transgenen Mäusen, die APP751 sowohl mit der Schwedischen (KM595/596NL) als auch mit der London (V717I) Mutation exprimierten, auch nicht [10]. Da diese Mäuse einen abnormal größeren A β ₁₋₄₂ Anteil aufweisen, wäre ein Effekt zu erwarten gewesen, wenn CI spezifisch durch diese Isoform inhibiert werden sollte. Die Sequenz 25-35 ist zwar in allen A β Isoformen enthalten, neigt aber vermehrt zu Aggregation [422], was einen Transport in die Mitochondrien fraglich macht. Zudem unterscheidet sich die A β ₂₅₋₃₅ Struktur von A β ₁₋₄₂. Ein strukturabhängiger Transport über das mitochondriale Translokasesystem, wie er von Hansson Petersen vorgeschlagen wurde [151], sollte demnach nicht möglich sein. Um die Atmungskettenkomplexe zu beeinflussen, müssen A β Peptide jedoch in die Mitochondrien gelangen können.

Nachdem durch den in-Lösung CI Aktivitätstest signifikante Ergebnisse erzielt wurden, sollten auch die Aktivitäten der anderen Atmungskettenkomplexe mittels in-Lösung Aktivitätstests untersucht werden. Der in-Lösung CII Aktivitätstest basiert auf der CII katalysierten Oxidation von Succinat zu Fumarat, die in der gleichzeitigen Reduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol-natrium (DCPIP) resultiert (siehe Abb. 29). Durch die Reduktion entfärbt sich der blaue Farbstoff. Diese Entfärbung kann als Absorptionsabnahme bei 600 nm verfolgt werden. Für den Aktivitätstest wurden frisch hergestellte Zelllysate Einfrier- und Auftau-Zyklen unterzogen, um die Zellmembran transient aufzubrechen. Die Zelllysate wurden mit CII Reaktionspuffer, der u.a. das Substrat Succinat enthielt, gemischt und die Aktivitätsmessung durch Zugabe von Decylubichinon gestartet. Um die Spezifität zu überprüfen wurde die Reaktion nach 150 s durch Zugabe von Malonat inhibiert (siehe 4.22.2, eine repräsentative Messung ist in Kapitel 7.9 D aufgeführt). Aus der Steigung des linearen Bereichs innerhalb des Absorptionsverlaufs errechnete sich die spezifische Enzymaktivität.

A β ₁₋₄₂ zeigte keinen Einfluss auf die spezifische CII Aktivität in Zelllysaten von OLN-93 Proben (OLL). In Zelllysaten von SH-SY5Y Proben wurde jedoch eine hochsignifikante Abnahme der CII Aktivität gefunden (-8,6%). Unbehandelte OLL wiesen eine höhere CII

Aktivität auf als unbehandelte SHL (+27,5%, siehe Abb. 61), was auf eine größere CII Proteinmenge in OLN-93 Zellen im Vergleich zu SH-SY5Y Zellen hindeuten könnte. Durch die Zugabe von Malonat im Überschuss wurde Komplex II kompetitiv gehemmt. Die Inhibition betrug bei jeder Messung über 98%, die für eine Spezifität der gemessenen CII Aktivität erhalten werden mussten [237]. Da für die Inhibitionsmessung positive Steigungen der Absorption erhalten wurden, war die errechnete Inhibition über 100%. Eine Inhibition über 100% ist in der Realität allerdings nicht möglich, war im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber dem Versuchsaufbau geschuldet. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass durch Erhalt einer positiven Steigung eine 100%ige Inhibition vorlag.

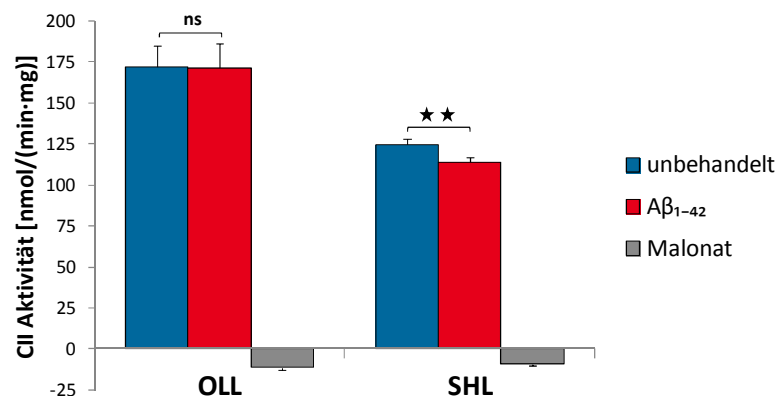


Abb. 61: Aβ₁₋₄₂-vermittelte Abnahme der Aktivität von Komplex II. Der CII in-Lösung Aktivitätstest basiert auf der Reduktion von DCPIP bei 600 nm vermittelt durch die CII katalysierte Oxidation von Succinat zu Fumarat. In Zelllysaten von OLN-93 (OLL, N=3, n=2) wurde keine Aβ₁₋₄₂-induzierte Veränderung der spezifischen CII Aktivität beobachtet, wohingegen die CII Aktivität in Zelllysaten von SH-SY5Y (SHL, N=4, n=2) hochsignifikant abnahm. Die CII Aktivitätsmessung war spezifisch, weil die Aktivität in Gegenwart des CII Inhibitors Malonat um mehr als 98% sank. (MW ± Stabw, ★★: p ≤ 0,01, ns: nicht signifikant)

Eine Abnahme der CII Aktivität konnte bisher nur in Mitochondrien aus Hirnbiopsien von Alzheimerpatienten nachgewiesen werden [418]. Studien mit APP695 transfizierten SH-SY5Y Zellen [419] und primären Granularzellen des Cerebellums von 7-Tagen alten Wistar Ratten, die mit 2,0 μM Aβ₁₋₄₂ behandelt wurden [416], zeigten jedoch keinen Effekt von Aβ Peptiden auf die Aktivität von Komplex II. Da Komplex II ebenfalls ein Enzym des Citratzyklus ist, hätte eine Aktivitätsminderung ebenfalls Auswirkungen auf den Glucosemetabolismus.

Durch eine gleichzeitige Beeinträchtigung von Komplex I und II wird weniger Ubichinon reduziert und somit werden auch weniger Elektronen zu Komplex III transferiert. Demzufolge wäre es hoch interessant gewesen, die Aktivität von CIII zu bestimmen, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolglos versucht wurde.

Der in-Lösung CIII Aktivitätstest beruhte auf der CIII katalysierten Reduktion von Cyt c in Anwesenheit von Decylubichinol, die photometrisch bei 550 nm als Absorptionszunahme (Bildung von red. Cyt c) verfolgbar ist. Das für diesen Versuch benötigte Decylubichinol wurde frisch durch Reduktion von Decylubichinon mit Kaliumborhydrid bei pH 2 hergestellt. Im CIII Reaktionspuffer bei pH 7,5 war Decylubichinol allerdings nicht stabil. Durch Auto-

oxidation wurde es in Abwesenheit von CIII wieder zu Decylubichinon konvertiert. Diese Reaktion geht mit der Generierung von Superoxiden und Peroxiden einher, die Cyt c reduzieren [423], wodurch ein Anstieg der Basislinie am Photometer beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Eine spezifische Messung war somit nicht möglich.

Mein Kollege Michael Muschol reduzierte Decylubichinon mit Natriumdithionit nach Benit et al. [424], zeigte allerdings keine Basislinie für seine Messungen der CIII Aktivität von BHM [413], weshalb an dieser Stelle keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob es bei ihm ebenfalls zur Autooxidation von Decylubichinol kam. Sarah Bothe zeigte im Rahmen ihrer Masterarbeit, dass es auch bei der Reduktion von Decylubichinon mit Natriumdithionit zur Autooxidation kommt [425]. Weitere Varianten der Reduktion von Decylubichinon favorisierten das Protokoll nach Cadenas et al. [426], nach dem Decylubichinon mit Kaliumborhydrid bei alkalischem pH reduziert und durch die Zugabe von EDTA bei saurem pH stabilisiert wird. Allerdings wurde auch für Decylubichinol hergestellt nach Cadenas et al. [426] im CIII Reaktionspuffer Autooxidation im Photometer nachgewiesen, die Steigung war jedoch geringer als bei vorherigen Versuchen. Es wurde davon ausgegangen, dass Metallionen ebenfalls an der Autooxidation beteiligt sind, weshalb die Konzentration von EDTA erhöht wurde. Bei einer 10-fach höheren EDTA Konzentration als nach Cadenas et al. wurde eine horizontal verlaufende Basislinie erhalten, allerdings wurde nun keinerlei CIII Aktivität mehr gemessen, weil neben den störenden Metallionen in der Lösung wahrscheinlich auch die Eisenionen aus den Eisen-Schwefel-Zentren von CIII und/oder Cyt c komplexiert wurden. Der in-Lösung CIII Aktivitätstest konnte daher für Zellkulturproben bisher nicht in der AG Dencher etabliert werden.

In der Literatur finden sich keine Hinweise auf geänderte CIII Aktivitäten durch A β Peptide. Dies könnte entweder daran liegen, dass A β keinen Einfluss auf die CIII Aktivität hat, weshalb dieser Fund nicht publiziert wurde, oder daran, dass die oben beschriebenen Schwierigkeiten auch bei anderen Forschern auftreten, weshalb die Bestimmung der spezifischen CIII Aktivität nicht möglich ist.

Der in-Lösung CIV Aktivitätstest reflektiert die CIV katalysierte Oxidation von Cyt c als Absorptionsabnahme bei 550 nm. Dafür wurden frisch hergestellte Zelllysate Einfrier- und Auftau-Zyklen unterzogen, um die Zellmembran transient aufzubrechen. Die Reaktion wurde durch Mischen der Zelllysate mit CIV Reaktionspuffer, der reduziertes Cyt c enthielt, gestartet. Nach 150 s wurde die Reaktion durch die Zugabe von KCN inhibiert, um die Spezifität zu überprüfen (siehe 4.22.2, eine repräsentative Messung ist in Kapitel 7.9 F aufgeführt). Die spezifische Enzymaktivität errechnete sich analog zu der von CII.

Im Gegensatz zu den CI und CII Aktivitäten wurde für beide Zelllinien ein Anstieg der spezifischen CIV Aktivität in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben erhalten (+15,2% für OLL, nicht signifikant und +24,7% für SHL, hochsignifikant). Ebenfalls im Gegensatz zu den CI und CII Aktivitäten zeigten unbehandelte SHL eine höhere Aktivität als unbehandelte OLL (+24,5%). Durch KCN wurden die CIV Aktivitäten zu 97 bis 100% inhibiert (siehe Abb. 62). Ab einer Inhibition von 95% konnte von einer spezifischen CIV Aktivitätsmessung ausgegangen werden [237].

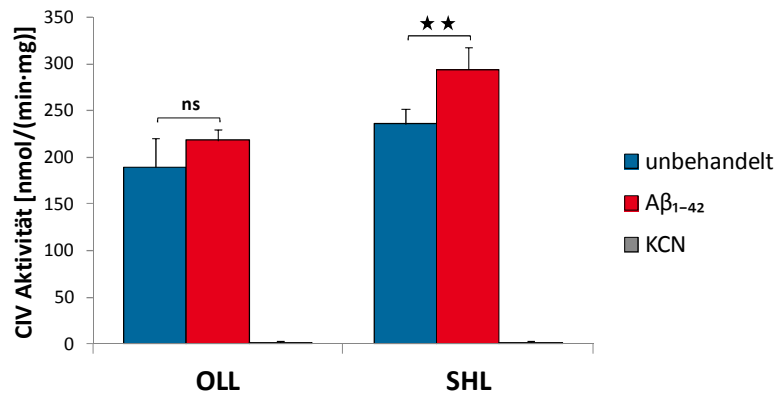


Abb. 62: Aβ₁₋₄₂-vermittelte Zunahme der Komplex IV Aktivität. Der in-Lösung CIV Aktivitätstest basiert auf der CIV katalysierten Oxidation von Cyt c, die bei 550 nm verfolgt werden kann. In Zelllysaten von OLN-93 (OLL, N=4, n=2) und SH-SY5Y (SHL, SHL: N=5, n=2) wurde ein Aβ₁₋₄₂-induzierter Anstieg der spezifischen CIV Aktivität ermittelt, der für SHL signifikant war. Die CIV Aktivitätsmessung war spezifisch, weil die Aktivität in Gegenwart des CIV Inhibitors KCN um mehr als 95% sank. (MW ± Stabw, ★★: p ≤ 0,01, ns: nicht signifikant)

Der in-Gel CIV Aktivitätstest mit OLM (siehe Abb. 57) ließ vermuten, dass die totale CIV Aktivität durch Aβ₁₋₄₂ zunimmt, was im Einklang mit den Ergebnissen aus in-Lösung CIV Aktivitätstests steht. Für Aβ₁₋₄₂-behandelte SHM wurden im in-Gel CIV Aktivitätstest jedoch Tendenzen zu niedrigeren Aktivitäten erhalten, wohingegen höhere Aktivitäten im in-Lösung CIV Aktivitätstests gefunden wurden. Aufgrund des hohen Hintergrundsignals und der gleichzeitig geringen Intensität der Färbung, die durch CIV Aktivität hervorgerufen wurde, wurden die Ergebnisse des in-Gel CIV Aktivitätstest als sehr kritisch angesehen.

In Mitochondrien (aus lymphoblastoiden Zellen), die mit 167 μM Aβ₁₋₄₂ für 5 min behandelt wurden, wurde ein nicht signifikanter Anstieg der CIV Aktivität um schätzungsweise 30% beobachtet [427]. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit wurden isolierte Mitochondrien mit Aβ₁₋₄₂ inkubiert. Dadurch lässt sich im Vergleich zum Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit die Inkubationszeit drastisch verringern und die lokale Aβ₁₋₄₂ Konzentration an den Mitochondrien erhöhen. Darüber hinaus wurde eine sehr hohe Aβ₁₋₄₂ Konzentration gewählt. Es wurde daher davon ausgegangen, dass es sich bei der bestimmten Aktivitätszunahme durch Aβ₁₋₄₂ um den Maximaleffekt handelte. Einen nicht signifikanten Anstieg der CIV Aktivität um ca. 10% wiesen SH-SY5Y Zellen auf, die stabil APP_{swe} (APP mit schwedischer Mutation) überexprimierten [428].

Die vorherrschende Literaturmeinung ist jedoch, dass die Aktivität von Komplex IV durch Aβ Peptide negativ beeinflusst wird [10, 416, 418-421, 429-431]. In Zellkulturen wurde dieser Effekt sowohl an humanen SH-SY5Y Zellen [419] als auch an murinen PC12 Zellen [429] beobachtet, wobei beide Zelllinien stabil mit APP_{wt} transfiziert waren. PC12 Zellen, denen Aβ₁₋₄₂ extern appliziert wurde, zeigten ebenfalls eine Verringerung der CIV Aktivität nach 24 h, auch wenn diese nicht so ausgeprägt war wie in transfizierten Zellen [429]. Erste Studien in den 1990er Jahren an post-mortem-Gehirnen von Alzheimerpatienten wiesen geringere CIV Aktivitäten im Cortex und dem Hippocampus auf [418, 430, 431]. Am AD-Mausmodell wurde ebenfalls eine Reduktion der CIV Aktivität beobachtet. Die transgenen Mäuse exprimierten APP751 sowohl mit der Schwedischen (KM595/596NL) als auch mit der

London (V717I) Mutation und zum Zeitpunkt der Untersuchung (6-8 Monate) wiesen sie bereits A β Plaques auf [10]. Interessanterweise veränderte sich die CIV Aktivität in transgenen P301L tau Mäusen nicht [432]. P301L tau Mäuse exprimieren die längste humane Gehirn-tau Isoform (htau40) mit der Mutation P301L, wodurch sie im Alter von 3 Monaten hyperphosphoryliertes tau aufweisen und mit 6 Monaten NFTs. Sie exprimieren aber kein humanes A β Peptid. Daraus lässt sich schließen, dass Änderungen in der CIV Aktivität spezifisch durch A β Peptide induziert werden.

Die durch A β_{1-42} gestiegenen CIV Aktivitäten ließen sich durch die bisherigen Erkenntnisse, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, nicht erklären. Dies führte zu der Annahme, dass es sich dabei um einen Kompensationsmechanismus handeln könnte, um den elektrochemischen Gradienten aufrecht zu halten. Unter physiologischen Bedingungen wäre ein CIV Aktivitätssteigerung bei gleichzeitiger Verminderung der CI und CII Aktivität bioenergetisch nicht sinnvoll. Es ist allerdings denkbar, dass sich durch A β_{1-42} die Assemblierungszustände der Atmungskettenkomplexe ändern. Die vermehrte Assemblierung zu den Superkomplexen I₁III₂IV₁₋₃ würde eine Aktivitätssteigerung erklären, weil CIV innerhalb dieser Superkomplexe am aktivsten ist [311, 413-415].

Die sinkenden CI und CII Aktivitäten in A β_{1-42} -behandelten SHM Proben könnten auch auf eine geringere Proteinmenge des jeweiligen Komplexes zurückzuführen sein. Dies könnte z.B. mit einer Blockade der Importmaschinerie durch A β_{1-42} Peptide zusammenhängen [115, 150], was die Verfügbarkeit kerncodierter CI und CII Untereinheiten in den Mitochondrien limitieren würde. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass DNA-Schäden bzw. posttranslationale Modifikationen (z.B. Proteinoxidation) in mitochondrial codierten CI Untereinheiten zu Aktivitätsverlusten führen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass vermehrte ROS Mengen in A β_{1-42} -behandelten Proben zu einem leichten Anstieg der Proteinoxidation in den Mitochondrien führt (siehe Abb. 56), wovon auch die Proteine der Atmungskette betroffen sein könnten. Eine zusätzliche Analyse des mitochondrialen Proteoms sollte Aufschluss über die Proteinmenge geben um sicherzustellen, dass alle Untereinheiten des jeweiligen Atmungskettenkomplexes vorhanden sind.

In-Gel CV Hydrolyseaktivitätstest

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen A β_{1-42} -induzierten Änderungen in der Aktivität von Atmungskettenkomplexen könnten sich auch auf die ATP Synthese auswirken. Um diese Annahme zu überprüfen, sollte die ATP Synthase Aktivität bestimmt werden. Die Aktivität der ATP Synthase kann indirekt durch ihre Umkehrreaktion, die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i, gemessen werden [433-435]. Da die ATP Synthase wie die anderen Atmungskettenkomplexe in verschiedenen Assemblierungszuständen (Monomer und Homooligomere) vorkommt [140], wurde ein in-Gel CV Hydrolyseaktivitätstest durchgeführt, um die Aktivitäten innerhalb der verschiedenen Assemblierungszustände untersuchen zu können. Dafür wurden 120 μ g Mitochondrienproteine in einer BN-PAGE aufgetrennt und dann über Nacht in einer Lösung geschwenkt, die sowohl ATP als auch Bleinitrat enthielt (siehe 4.22.1.2). Durch CV Hydrolyseaktivität frei werdendes Phosphat reagierte mit Bleinitrat zu Bleiphosphat, wodurch sich ein weißes Präzipitat auf allem Komplex V enthaltenen Banden bildete [270].

Der qualitative CV Hydrolyseaktivitätstest zeigte die Endpunktaktivität. Elisabeth Krämer versuchte im Rahmen ihrer von mir betreuten Masterarbeit die CV Hydrolyseaktivität für Zellkulturproben zu etablieren. Sie erhielt jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse. Zum einen unterschieden sich die Bandenintensitäten der verschiedenen Assemblierungszustände innerhalb einer Probe und zum anderen variierten die Bandenintensitäten auch zwischen den Proben (Daten nicht gezeigt). Anhand ihrer Ergebnisse konnte lediglich die Lage der CV Banden innerhalb des BN-Gels eindeutig identifiziert werden (siehe Abb. 39F), wodurch der BN Western Blot mit dem CV-Antikörper verifiziert werden konnte (siehe Abb. 39E). Aufgrund der nicht vorhandenen Reproduzierbarkeit wurde auf einen quantitativen CV Hydrolyseaktivitätstest in Abhängigkeit von A β ₁₋₄₂ verzichtet.

Zu einem späteren Zeitpunkt fand mein Kollege Sven Marx heraus, dass die ATP Hydrolyse sehr viel schneller abläuft, wenn die Proteine innerhalb eines klar-nativen (*clear-native*, CN) Gels aufgetrennt wurden [277]. Für BHM verringerte sich so die Zeit bis zur anfänglichen Präzipitatbildung von 1 h auf wenige Minuten für das Monomer, von 2 h auf 15 min für das Dimer und von 16 h auf 30 min für die höheren Oligomere. Der Grund für die sehr langsame Hydrolyseaktivität im BN-Gel war die Anwesenheit von Coomassie-Brilliantblau während der nativen Gelelektrophorese. Zum einen beeinträchtigt der an die Proteine gebundene Farbstoff die Zugänglichkeit des Substrates ATP [434] und zum anderen kommt es bei höheren Coomassiekonzentrationen zu einer Destabilisierung der höheren CV Oligomere [436] sowie der Dissoziation des CV Monomers in den hydrophilen F₁ Kopfteil und den membranständigen F₀ Teil [437].

Die nicht vorhandene Reproduzierbarkeit der in-Gel CV Hydrolyseaktivitätstests mit Zellkulturproben ließ sich daher sehr wahrscheinlich auf die Anwesenheit von Coomassie-Brilliantblau während der nativen Gelelektrophorese zurückführen. Aus zeitlichen Gründen wurde kein in-Gel CV Hydrolyseaktivitätstest innerhalb CN-Gelen durchgeführt.

Zelluläre ATP Konzentration

Anhand der bisherigen Erkenntnisse konnte lediglich vermutet werden, dass sich A β ₁₋₄₂ indirekt oder direkt auf die ATP Synthese auswirkt. Um zu überprüfen, ob A β ₁₋₄₂-behandelten Zellen ausreichend ATP für energieverbrauchende Prozesse zur Verfügung steht, wurde die zelluläre ATP Konzentration bestimmt. Dafür wurden unbehandelte, A β ₁₋₄₂- und A β ₄₂₋₁-behandelte Zellen geerntet, lysiert und mit Substratlösung, die u.a. D-Luciferin und Luciferase enthielt, inkubiert. Die ATP-vermittelte oxidative Decarboxylierung von D-Luciferin durch Luciferase emittierte Licht, das am Luminometer gemessen wurde (siehe 4.18).

Für beide Zelllinien nahm die ATP Konzentration in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben höchst signifikant um ca. 15% ab im Vergleich zu unbehandelten Proben (siehe Abb. 63). OLN-93 Kontrollzellen, die mit dem reversen Peptid (A β ₄₂₋₁) inkubiert wurden, verhielten sich wie unbehandelte Zellen, SH-SY5Y Kontrollzellen hingegen zeigten eine kleine nicht signifikante Abnahme (-3,3 %) der ATP Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Trotzdem lag auch hier im Vergleich mit A β ₁₋₄₂-behandelten Proben eine signifikante Verringerung (-12,3%) der ATP Konzentration vor. Im Vergleich zu unbehandelten OLN-93 Zellen wiesen unbehandelte SH-SY5Y Zellen eine 8,4% höhere zelluläre ATP Konzentration auf. Die gemessenen Absolutwerte der ATP Konzentration für unbehandelte Proben waren vergleich-

bar mit denen von meiner Kollegin Tamara Dzinic, die ebenfalls mit OLN-93 und SH-SY5Y Zellen arbeitet (unveröffentlichte Daten).

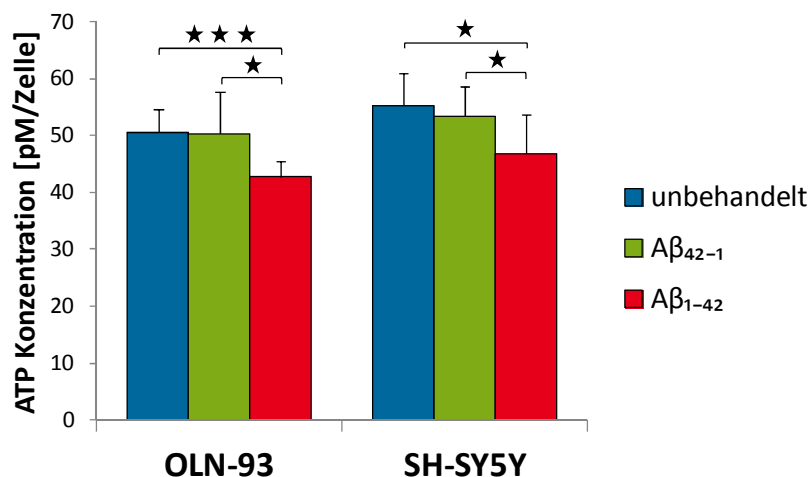


Abb. 63: Abnahme der ATP Konzentration durch Aβ₁₋₄₂. In OLN-93 und SH-SY5Y Zellen wurde die Lumineszenz gemessen, die durch die ATP-vermittelte oxidative Decarboxylierung von D-Luciferin durch Luciferase entstand. Aβ₁₋₄₂-behandelte Proben wiesen eine niedrigere ATP Konzentration auf als unbehandelte Proben. Kontrollzellen (Aβ₄₂₋₁) verhielten sich wie unbehandelte Zellen (OLN-93) bzw. zeigten eine geringe Abnahme der ATP Konzentration (SH-SY5Y). (N = 9, n = 3, MW ± Stabw, ***: p ≤ 0,001, *: p ≤ 0,05)

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fanden Keil et al. [429] eine etwa 13%ige Abnahme der ATP Konzentration in murinen PC12 Zellen, die mit 1,0 bis 100 nM Aβ₁₋₄₂ für 24 h behandelt wurden. Eine Reduktion der ATP Konzentration tritt demnach bereits bei sehr geringen Aβ₁₋₄₂ Mengen auf und bleibt dann relativ konstant. Interessanterweise ist der Effekt größer, wenn PC12 Zellen stabil mit APP_{wt} (-28%) oder APP_{swe} (-37%) transfiziert sind [429]. Murine N2a Zellen, die ebenfalls APP_{wt} oder APP_{swe} exprimierten, zeigten wie transfizierte PC12 Zellen eine größere Abnahme der ATP Konzentration (-21% bzw. -28%) [371] im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten. Es lässt sich daher vermuten, dass Aβ₁₋₄₂ nicht alleine für den Rückgang der ATP Konzentration verantwortlich ist, sondern die anderen Spaltprodukte bei der amyloidogenen APP Prozessierung auch eine Rolle spielen könnten. Aufgrund der Tatsache, dass in Zellen, die APP mit der schwedischen Mutation exprimierten, weniger ATP vorhanden war, als in Zellen, die das Wildtyp-APP exprimierten, scheint Aβ₁₋₄₂ jedoch ein wichtiger Faktor zu sein. SH-SY5Y Zellen, die mit APP695 transfiziert waren, zeigten eine zu PC12/N2a APP_{wt} Zellen vergleichbare Reduktion der ATP Konzentration (-23%) [419]. Wenn die Aβ₁₋₄₂ Generierung durch eine doppelte Mutation (APP_{swe} und Mutation im PS1) weiter erhöht wird, wird in primären Hirnneuronen, die aus APP/PS1 Mäusen im embryonalen Stadium E15-16 gewonnen wurden, 38% weniger ATP gemessen [372]. Demzufolge scheint Aβ₁₋₄₂ tatsächlich eine wichtige Rolle zu spielen. Im AD-Mausmodell konnte sogar gezeigt werden, dass die Aβ-induzierte Verringerung der ATP Konzentration (-30%) vor der Plaquebildung stattfindet und konstant bleibt, auch wenn sich Plaques formiert haben. Für diese Untersuchungen wurden transgene Mäuse verwendet, die APP751 sowohl mit der Schwedischen

(KM595/596NL) als auch mit der London (V717I) Mutation exprimierten. In diesen Tieren ist nach 3 Monaten intrazelluläres A β nachweisbar und ab 6 Monaten bilden sich Plaques aus [10].

Auch wenn A β ₁₋₄₂ die zelluläre ATP Konzentration verringerte, schienen die Zellen trotzdem noch ausreichend Energie zu haben, denn ein Zelltod wurde in diesem Stadium nicht induziert (siehe Abb. 54 und [376, 429]). Es ist jedoch weiterhin unbekannt, ob durch die ATP Synthese weniger ATP gebildet wird (hätte durch den CV Hydrolyseaktivitätstest nachgewiesen werden können) oder ob mehr Energie verbraucht wird, z.B. für Reparaturprozesse. Die Funktion der ATP Synthase könnte zum einen durch eine Verringerung des mitochondrialen Membranpotenzials, hervorgerufen durch die Beeinträchtigung der CI und CII Aktivität, gestört sein. Zum anderen könnten A β ₁₋₄₂ Peptide auch direkt Einfluss auf Komplex V nehmen. Dadurch, dass geringere CI und CII Aktivitäten gemessen wurden (siehe Abb. 60B und Abb. 61), war zu vermuten, dass weniger Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transferiert wurden. Dies hätte eine Verringerung des für die ATP Synthese benötigten elektrochemischen Gradienten zufolge. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob sich A β ₁₋₄₂ ebenfalls negativ auf das mitochondriale Membranpotenzial auswirkt.

5.3.5 A β ₁₋₄₂ beeinflusste die mitochondrialen Membranen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass A β ₁₋₄₂ einen Aktivitätsverlust in den Komplexen I und II induzierte. Darüber hinaus verringerte sich die ATP Konzentration. (siehe 5.3.4). Da das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) ein wichtiger Faktor bei der oxidativen Phosphorylierung und der anschließenden ATP Synthese ist, wurde untersucht, ob die Defizite im Energiestoffwechsel mit Änderungen im MMP zusammenhängen.

Mitochondrien mit niedrigem Membranpotenzial können von denen mit hohem mittels des kationischen Farbstoffs JC-1 unterschieden und somit quantifiziert werden. Unter physiologischen Bedingungen aggregieren JC-1 Monomere in den Mitochondrien zum sogenannten J-Aggregat, wodurch es selektiv in den Mitochondrien zu einer bathochromen Fluoreszenzverschiebung kommt. In gesunden Zellen werden parallel cytosolisches Monomer und mitochondriale J-Aggregate gefunden. Ist das MMP z.B. durch den Ionophor CCCP eliminiert worden, bilden sich so gut wie keine J-Aggregate in den Mitochondrien, weil die Akkumulation potenzialabhängig ist. Um zu untersuchen, ob A β ₁₋₄₂ das MMP beeinflusst wurden OLN-93 und SH-SY5Y Zellen, unbehandelt und mit A β behandelt (siehe 4.12.1), für 20-30 min mit JC-1 inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Der 488 nm Laser regte sowohl das Monomer als auch das J-Aggregat an (siehe Abb. 64). Da die grüne Fluoreszenz des Monomers in den Fluoreszenzkanal des J-Aggregates hinein strahlte (Überlappung der Emissionsspektren), musste kompensiert werden, um die beiden Fluoreszenzen voneinander zu trennen. Die Anregung mit 25 mW Laserpower (siehe Abb. 64) anstelle der standardmäßig verwendeten 100 mW (siehe 7.10) führte zwar zu einer Reduktion der Kompensationswerte um ca. 50%, klar voneinander getrennte Zellpopulationen wurden im Dichtediagramm (J-Aggregat/Monomer) jedoch nicht erhalten (siehe dazu z.B. Abb. 64 oben rechts). Da eine eindeutige Abgrenzung zwischen der Monomer- und J-Aggregat-Fraktion somit nicht sicher gestellt werden konnte, konnte für beide Zelllinien keine quantitative Auswertung erfolgen.

Visuell ließ sich kaum ein Unterschied zwischen den verschiedenen Proben (unbehandelt, A β ₁₋₄₂- bzw. A β ₄₂₋₁-behandelt) ausmachen (Daten für OLN-93 nicht gezeigt). Aus diesem Grund schlagen Perelman et al. [438] vor, JC-1 mit einem 405 nm Laser anzuregen. Die Anregung der beiden Fluorophore ist dadurch zwar sehr viel weniger effizient, die Emissionsüberlappung ist allerdings um fast das Fünffache geringer, wodurch das J-Aggregat besser vom Monomer unterschieden werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte JC-1 jedoch nicht mit einem 405 nm Laser angeregt werden, weil die zur Verfügung gestandenen Durchflusszytometer nicht mit diesem Laser ausgestattet waren. Eine weitere Möglichkeit wäre gewesen, das J-Aggregat selektiv mit dem 561 nm Laser anzuregen. Dies war jedoch aus technischen Gründen nicht möglich (der 488 nm Laser konnte nicht ausgeschaltet werden).

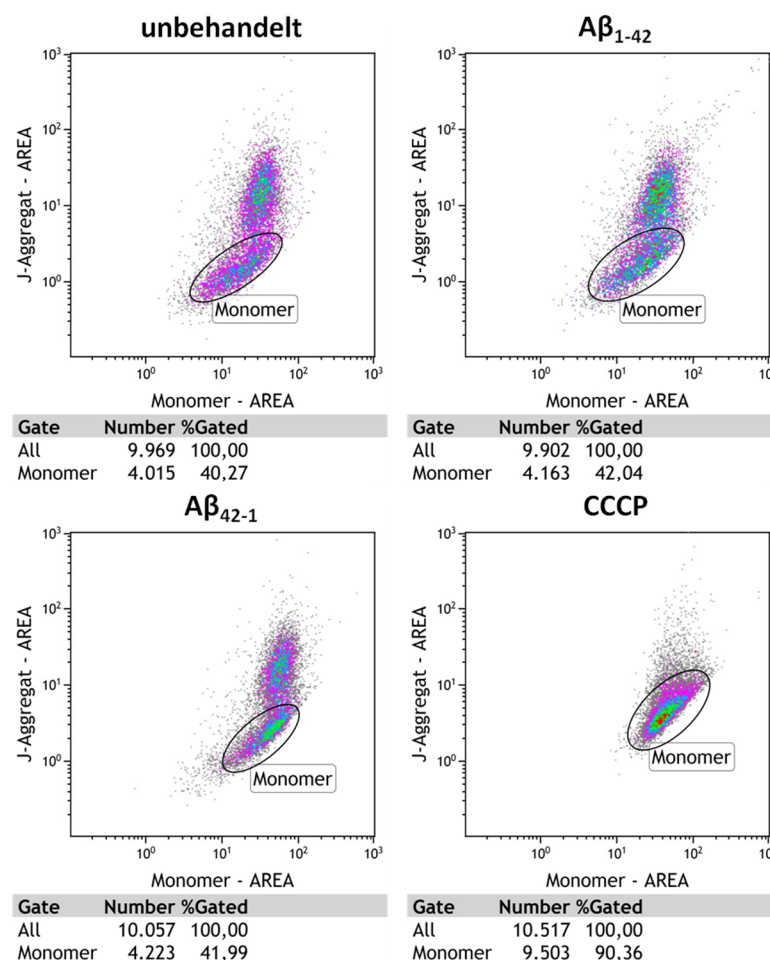
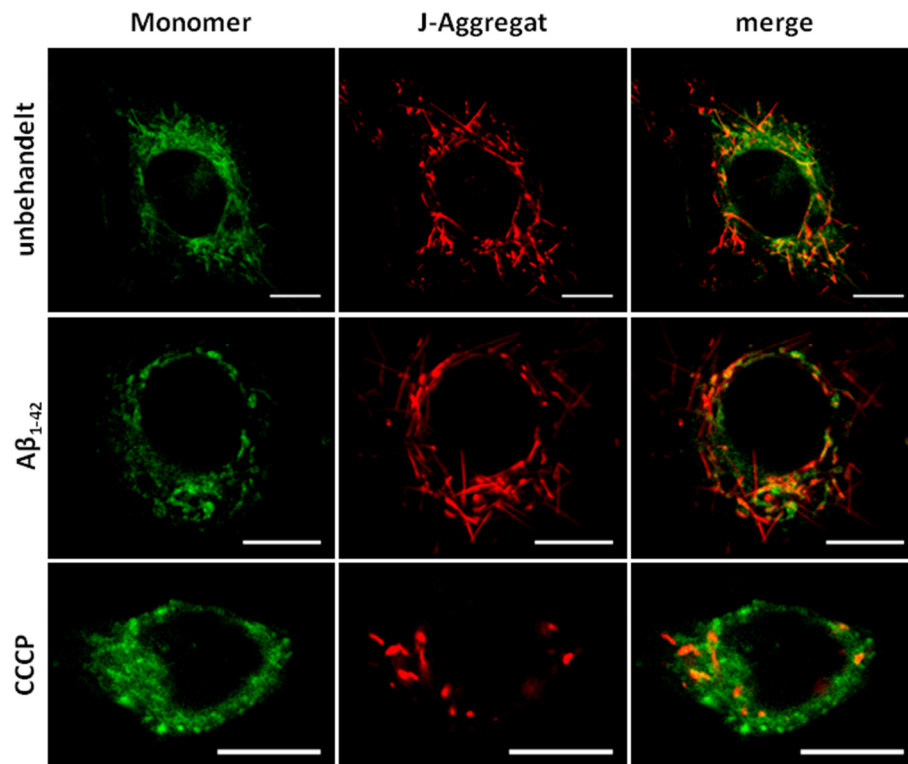


Abb. 64: Keine A β ₁₋₄₂-induzierte Veränderung des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) bestimmbar aufgrund technischer Komplikationen. SH-SY5Y Zellen, unbehandelt oder für 24 h behandelt mit 2,0 μ M A β ₁₋₄₂ bzw. A β ₄₂₋₁, wurden nach Färbung mit JC-1 hinsichtlich des JC-1 Monomers (entspricht niedrigem MMP) durchflusszytometrisch analysiert. Der verwendete 488 nm Laser (25 mW) regte ebenfalls das J-Aggregat (2. Zellpopulation, entspricht hohem MMP) an. Es wurden trotz Kompensation (10,84% in FL3) keine klar voneinander abzutrennenden Zellpopulationen für das Monomer und das J-Aggregat erhalten, wodurch eine Quantifizierung nicht möglich war. CCCP-behandelte Zellen zeigten eine fast vollständige Eliminierung des MMP.

Da sowohl ein 405 nm als auch ein 651 nm Laser am Konfokalmikroskop vorhanden waren, wurde versucht das MMP mittels JC-1 visuell zu ermitteln (siehe 4.12.1). In OLN-93 Zellen wurden keine Unterschiede zwischen unbehandelten und A β ₁₋₄₂-behandelten Zellen beobachtet, wohingegen es in A β ₁₋₄₂-behandelten SH-SY5Y Zellen so aussah, als würde die Anzahl fragmentierter Mitochondrien leicht zunehmen (siehe Abb. 65). Diese Einschätzung ist jedoch sehr subjektiv, weil mit dem Auge nicht zuverlässig quantifiziert werden kann. Veränderte Intensitäten der Monomer- bzw. J-Aggregat-Fluoreszenzen wurden für beide Zelllinien nicht wahrgenommen. Unter Verwendung des unphysiologischen A β ₂₅₋₃₅ Peptids mit einer hohen Konzentration von 25 μ M ist es allerdings möglich nach einer 24-stündigen Inkubation eine Reduktion des MMP im Konfokalmikroskop mittels JC-1 zu beobachten [439]. Im Vergleich zur Kontrolle war die grüne Fluoreszenz des Monomers intensiver und die rote Fluoreszenz des J-Aggregates schwächer, was auf eine Verringerung des MMP hindeutete. Da Jang et al. [439] lediglich Übersichtsabbildungen von murinen PC12 Zellen zeigten, lässt sich hier keine Aussage über den Fragmentierungsgrad der Mitochondrien machen.

Die Quantifizierung des MMP mittels JC-1 war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Trotzdem muss an dieser Stelle festgehalten werden, dass die Methode prinzipiell funktioniert hat, wie an der Positivkontrolle (CCCP-behandelte Zellen) ersichtlich ist. Nach Eliminierung des MMP war im Dichtediagramm (J-Aggregat/Monomer) fast ausschließlich die Monomerpopulation auszumachen (siehe Abb. 64 unten rechts), weil JC-1 potenzialabhängig in den Mitochondrien aggregiert. Im Konfokalmikroskop zeigte sich zudem eine Fragmentierung der wenigen Mitochondrien, die noch ein hohes MMP (rote Fluoreszenz) aufwiesen. Lange, fadenförmige Mitochondrienstrukturen konnten in CCCP-behandelten Zellen nicht mehr beobachtet werden (siehe Abb. 65).

OLN-93



SH-SY5Y

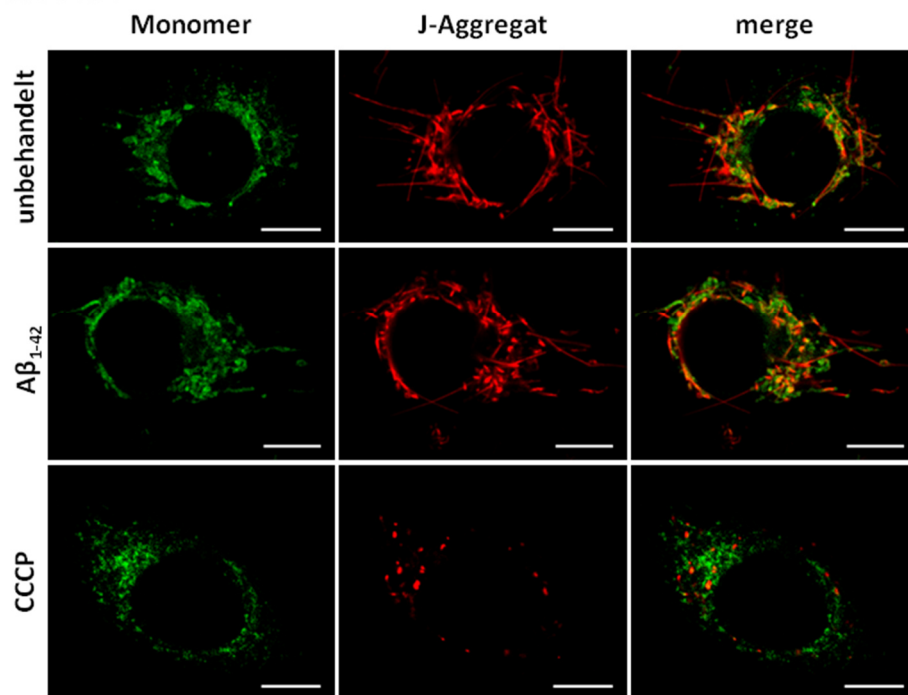


Abb. 65: Keine wesentlichen visuellen Unterschiede im mitochondrialen Membranpotenzial zwischen unbehandelten und A β_{1-42} -behandelten Zellen. Adhärenz auf einem Deckgläschen wachsende Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation mit 2,0 μ M A β_{1-42} am Konfokalmikroskop analysiert. Für OLN-93 Zellen wurden keine Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Zellen beobachtet. In SH-SY5Y Zellen schien es eine leichte Zunahme der Mitochondrienfragmentierung zu geben. Veränderte Fluoreszenzintensitäten wurden für beide Zelllinien nicht wahrgenommen. (Größenmaßstab: 10 μ m)

Aufgrund der weiter oben beschriebenen Ergebnisse musste nach einer alternativen Möglichkeit gesucht werden, um die Auswirkungen von A β ₁₋₄₂ auf das MMP untersuchen zu können. Reduzierte Varianten von MitoTrackern® vermögen Hinweise auf das MMP zu geben, indem sie ausschließlich in vitalen Mitochondrien mit intaktem Membranpotenzial akkumulieren und fluoreszieren. Eine Verringerung des MMP resultiert somit in einer niedrigeren Fluoreszenzintensität. OLN-93 und SH-SY5Y Zellen wurden nach 24-stündiger A β Inkubation für 5 min mit 1,0 μ M MitoTracker® Red CM-H₂XRos (MTR) gefärbt und am Durchflusszytometer untersucht (siehe 4.12.2). In beiden Zelllinien wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach A β ₁₋₄₂ Behandlung eine kleine Verschiebung der Zellpopulation hin zu niedrigeren Fluoreszenzintensitäten beobachtet, wohingegen sich Zellen, die mit dem Kontrollpeptid A β ₄₂₋₁ inkubiert wurden, ähnlich wie unbehandelte Zellen verhielten (siehe Abb. 66A). CCCP führte zu einer starken Verminderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Anhand der mittleren Fluoreszenzintensitäten wurde das MMP quantifiziert (siehe Abb. 66B). In A β ₁₋₄₂-behandelten OLN-93 Proben nahm das MMP hochsignifikant um 31,8% im Vergleich zu unbehandelten Proben ab. Verwunderlich war, dass ebenfalls das Kontrollpeptid A β ₄₂₋₁ negative Auswirkungen auf das MMP hatte (-17,0% im Vergleich zu unbehandelten Proben). Dies war anhand der Histogramme nicht erwartet worden. SH-SY5Y Zellen verhielten sich ähnlich wie OLN-93 Zellen. A β ₁₋₄₂ Behandlung führte zu einer hochsignifikanten Reduktion des MMP um 32,7% im Vergleich zu unbehandelten Proben, aber auch A β ₄₂₋₁-behandelte Proben zeigten eine Abnahme um 11,2%.

Die Ergebnisse deuteten eindeutig darauf hin, dass A β ₁₋₄₂ Peptide eine Depolarisation des MMP induzierten. Im Gegensatz zum Anteil apoptotischer Zellen (siehe Abb. 54), zur ROS Menge (siehe Abb. 55) und zur ATP Konzentration (siehe Abb. 63) hatte das Kontrollpeptid A β ₄₂₋₁ einen signifikanten Einfluss auf das MMP. Die Konsequenzen, die sich daraus ergeben, werden in der Schlussfolgerung (siehe Kapitel 6) diskutiert.

Im Vergleich zur Bestimmung des MMP mittels JC-1 waren die Ergebnisse, die mittels MTR erhalten wurden, überraschend eindeutig. Dies bekräftigte die Vermutung, dass mittels Durchflusszytometrie die Population für JC-1 Monomer positive Zellen tatsächlich nicht gut genug von der für J-Aggregat positive Zellen getrennt werden konnten. Verwunderlich war jedoch, dass am Konfokalmikroskop kein höherer Fragmentierungsgrad erkennbar war, denn bei einer 30%igen Reduktion des MMP wäre dies durchaus zu erwarten gewesen.

In Übereinstimmung mit dieser Arbeit fanden Keil et al. [429] in HEK Zellen, die mit APP_{swe} transfiziert waren, eine Verringerung des MMP um ca. 30%. Differenzierte SH-SY5Y Zellen, zeigten nach 12-stündiger Inkubation mit 2,5 μ M A β ₁₋₄₂ eine ca. 40%ige Reduktion des MMP [400] und in differenzierten PC12 Zellen verminderte sich das MMP nach 24-stündiger Inkubation mit 10 μ M A β ₁₋₄₂ um ca. 60% [369]. Demnach wird das MMP bereits frühzeitig durch geringe A β ₁₋₄₂ Konzentrationen beeinträchtigt. Diese Vermutung wurde dadurch bekräftigt, dass das MMP in transgenen Mäusen, die APP751 sowohl mit der Schwedischen (KM595/596NL) als auch mit der London (V717I) Mutation exprimierten, um schätzungsweise 25% reduziert war. Zum Zeitpunkt der Messung waren die Tiere drei Monate alt und wiesen intrazelluläres A β Peptid auf. Sechs Monate alte transgene Mäuse, die bereits A β Plaques gebildet hatten, zeigten eine Verringerung des MMP um ca. 19% [10]. Daraus lässt

sich schließen, dass die Depolarisation des MMP zu Beginn der AD Pathogenese entsteht und dann verhältnismäßig konstant bleibt.

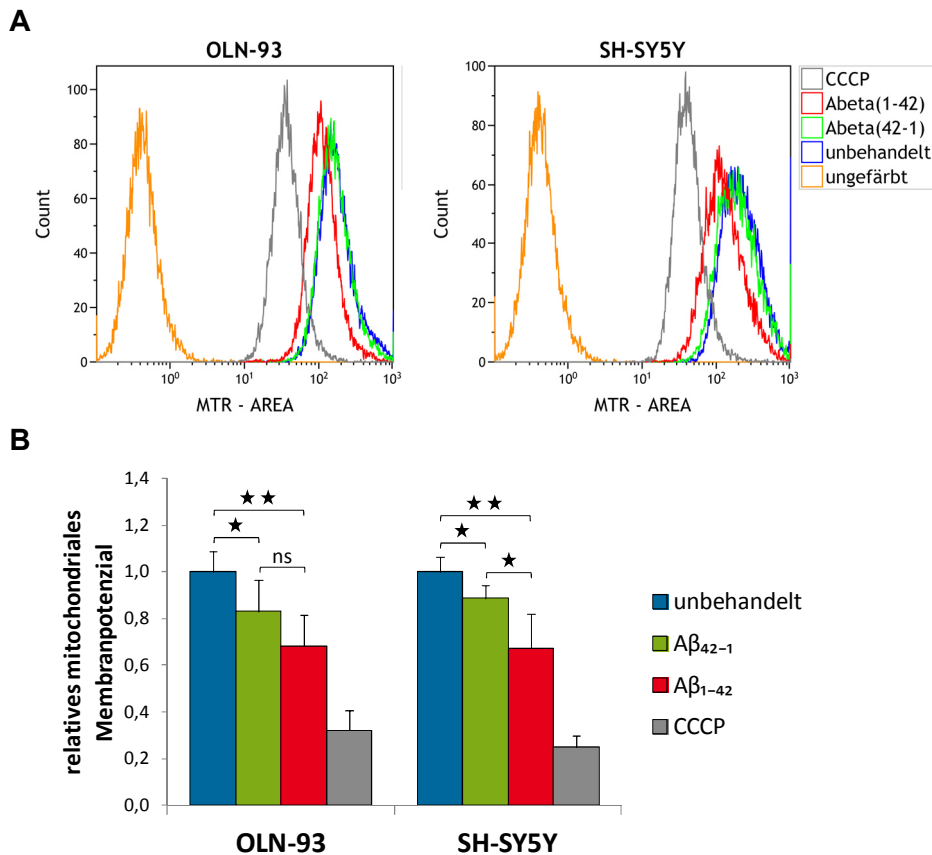


Abb. 66: Verringerung des mitochondrialen Membranpotenzials durch Aβ₁₋₄₂ in OLN-93 und SH-SY5Y Zellen. (A) Vitale Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red (MTR) angefärbt. Aβ₁₋₄₂ führte zu einer Verschiebung der Zellpopulation hin zu geringeren Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu unbehandelten und Aβ₄₂₋₁-behandelten Proben. (B) Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (N = 5, MW ± Stabw, **: p ≤ 0,01, *: p ≤ 0,05, ns: nicht signifikant). Unbehandelte Proben stellen das physiologische mitochondriale Membranpotenzial dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass sich die Aktivitäten von Komplex I und II durch Aβ₁₋₄₂ verringerten (siehe Abb. 60B und Abb. 61), wohingegen die CIV Aktivität anstieg (siehe Abb. 62). Komplex I, III und IV pumpen Protonen von der Matrix in den Intermembranraum. Da das MMP in Aβ₁₋₄₂-behandelten Proben verringert war, wurden insgesamt nicht genug Protonen über die Membran transportiert, um die Defizite von CI und CII zu kompensieren. Darüber hinaus sind die CIII und CIV Aktivität von den Aktivitäten von Komplex I und II abhängig. Eine verringerte Aktivität von CI und CII führt dazu, dass weniger Ubichinol auf CIII transferiert wird und somit auch weniger Cyt c von CIII auf CIV übertragen werden, was die Aktivität an CIII und CIV mindert. Dadurch werden durch alle drei protonenpumpenden Atmungskettenkomplexe weniger Protonen über die Membran transportiert, was in einer Depolarisation des MMP resultiert. Es könnte aber auch sein, dass ein verringertes MMP auf Poren/Kanäle in der Membran, deren Bildung von Aβ Peptiden induziert wird, zurückzuführen ist, wodurch die Membran durchlässig z.B. für Ionen wäre [155, 156].

Hansson Petersen et al. [151] lokalisierten in Rattenlebermitochondrien und humanen Hirnbiopsieproben einen Großteil (~75%) des A β ₁₋₄₂ Peptids an den Cristae der Mitochondrienmembran. Demzufolge scheinen A β ₁₋₄₂ Peptide mit mitochondrialen Membranen zu interagieren. Aus diesem Grund wurde analysiert, ob A β ₁₋₄₂ die physikalischen Eigenschaften der Lipidphase mitochondrialer Membranen beeinflusst.

Um Hinweise auf physikalische Eigenschaften der Lipidphase mitochondrialer Membranen von OLM und SHM zu erlangen, wurde die *steady-state* Fluoreszenzanisotropie von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH), interkaliert in das hydrophobe Innere der Lipiddoppelschicht, bestimmt (siehe 4.19). Anhand der *steady-state* Fluoreszenzanisotropie werden Informationen über die *orientational order* (Ordnungsparameter) und die Dynamik (proportional zur Viskosität) der Lipiddoppelschicht erhalten [440]. Anisotropieänderungen der Fluoreszenzsonde DPH geben Aufschluss über die der Sonde umgebene Membranordnung [441] und -viskosität [247]. Die Membranviskosität wird dabei vereinfacht als invers proportional zur "Fluidität" der von der Fluoreszenzsonde umgebenen Membran angesehen [248].

Die Anisotropie von DPH sank für OLM von 0,270 (unbehandelte Proben) um 7,8% auf 0,249 (A β ₁₋₄₂-behandelte Proben, siehe Abb. 67). Für SHM nahm die Anisotropie von 0,232 auf 0,217 ab (-6,7%). In einem zweiten Experiment (siehe 7.11) wurden dieselben Tendenzen erhalten. Der Abfall der Anisotropie in den A β ₁₋₄₂-behandelten Proben war hier lediglich um ca. 1% höher und die Anisotropiewerte der unbehandelten Proben waren mit 0,253 (OLM) bzw. 0,224 (SHM) etwas geringer als im ersten Experiment. Die geringere Anisotropie von DPH in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten Proben wies auf eine geringere Ordnung und/oder gesteigerte Dynamik der Lipidmoleküle hin [440]. Aufgrund der reziproken Beziehung zwischen der Membranviskosität und der "Fluidität" wird das im Rahmen dieser Arbeit erhaltene Ergebnis als Anstieg der "Fluidität" der mitochondrialen Membran (FMM) interpretiert.

Die A β ₁₋₄₂-vermittelten Anisotropieänderungen waren auf dem ersten Blick sehr klein (zwischen 0,015 und 0,023), aber höchstsignifikant. Unter der Berücksichtigung, dass sich die Skala der Anisotropie lediglich von 0 bis 0,4 erstreckt [441] und des geringen technischen Messfehlers, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit physiologisch relevante Veränderungen der physikalischen Eigenschaften der Mitochondrienmembran erhalten, die einen Beweis für den Einbau von A β ₁₋₄₂ Peptiden in die Membran darstellen.

Des Weiteren fiel auf, dass die Anisotropie von DPH für OLM 14,1% (11,5% im 2. Experiment) größer war als die für SHM (Vergleich der unbehandelten Proben). In den Membranen von SHM wurde somit eine geringere Ordnung und/oder gesteigerte Dynamik der Lipidmoleküle im Vergleich zu Membranen von OLM gefunden.

Änderungen der Anisotropie können auf eine geänderte Lipid- bzw. Proteinzusammensetzung der Mitochondrienmembran zurückzuführen sein. Mitochondriale Membranen bestehen hauptsächlich aus den Phospholipiden Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cardiolipin. Cholesterol und Sphingolipide werden hingegen kaum gefunden [442]. Eine Untersuchung der mitochondrialen Lipidzusammensetzung von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen in Abhängigkeit von A β ₁₋₄₂ war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich (Gerät defekt, geplant war die Membranlipidanalyse anhand der MALDI-TOF MS Methode

nach Angelini et al. [443, 444]). Aus diesem Grund konnte die Ursache für die Abnahme der Anisotropie in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben nicht eindeutig geklärt werden. Es lässt sich jedoch vermuten, dass eine Zunahme an (mehrfach) ungesättigten Fettsäuren ursächlich für die gefundenen Änderungen sein könnte. Diese Annahme kann allerdings nicht nachhaltig belegt werden, weil in der Literatur kaum Hinweise auf das mitochondriale Lipidom im Zusammenhang mit AD existieren. Die meines Wissens einzige Analyse wurde erst kürzlich von Monteiro-Cardoso et al. [445] an drei-Monate alten 3xTg-AD Mäusen durchgeführt. Sie entdeckten eine geänderte Phospholipidzusammensetzung in synaptischen Mitochondrienmembranen dieser transgenen Mäuse: Diacyl- sowie Lyso-Phosphatidylcholine kamen im Vergleich zu nichttransgenen Mäusen der gleichen Altersgruppe häufiger vor, Cardiolipine hingegen weniger. Zudem wurde ein größerer Anteil an (mehrfach) ungesättigten Fettsäuren insbesondere in Phosphatidylcholinen gefunden, was die anfängliche Vermutung bestätigte, dass die Abnahme der Anisotropie im Zusammenhang mit einer Änderung der Lipidzusammensetzung bzw. des Grades der ungesättigten Fettsäuren stehen könnte.

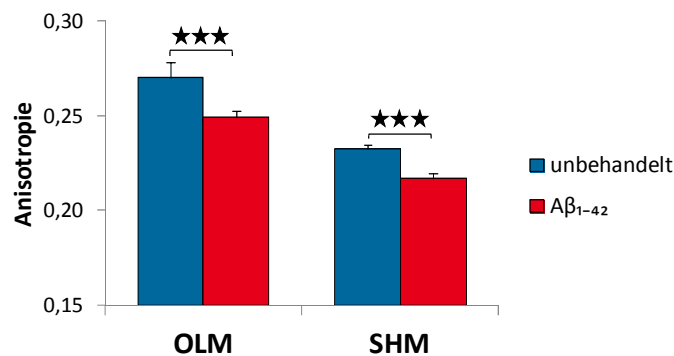


Abb. 67: A β ₁₋₄₂-induzierte Abnahme der Anisotropie von Mitochondrienmembranen in OLN-93 und SH-SY5Y Zellen. Es wurde die *steady-state* Fluoreszenzanisotropie von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH), interkaliert in das hydrophobe Innere der Mitochondrienmembran, bestimmt. Für A β ₁₋₄₂-behandelte Proben wurde eine Abnahme der Anisotropie gefunden. (n = 10, MW \pm Stabw, p \leq 0,001)

Bisherige Bestimmungen der "Membranfluidität" im Zusammenhang mit A β Peptiden beschränkten sich fast ausschließlich auf die Plasmamembran von Mäusen, Ratten und Menschen in biologischen Membranen oder auf Modellmembranen [446-457], weil die APP Prozessierung abhängig vom Cholesteringehalt der Membran ist und in dem Zusammenhang ein Anstieg der "Membranfluidität" zu einer vermehrten nicht-amyloidogenen Spaltung des APP durch die α -Sekretase führt [458, 459]. Allerdings tritt dieser Effekt erst bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit vier und mehr Doppelbindungen wie z.B. Arachidonsäure (20:4) und Eicosapentaensäure (20:5) auf [460].

Trotz diverser Studien [446-457] wird der Effekt von A β Peptiden auf die "Fluidität" der Plasmamembran kontrovers diskutiert. Dies könnte am Ursprung des Gewebes, der Präparation, dem Alter des Organismus oder aber auch am verwendeten A β Peptid (Isoform, Monomer, Oligomer, fibrillär) liegen. Auffällig ist jedoch, dass unabhängig von den genannten Ursachen zwei unterschiedliche Fluoreszenzsonden zum Einsatz kamen, die zu gegensätzlichen Ergebnissen führten. Wurde die Fluoreszenzanisotropie wie in der vorliegenden

Arbeit mit DPH (oder mit dem Derivat 1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien, TMA-DPH) gemessen, wurde eine A β -induzierte Reduktion der "Fluidität" der Plasmamembran erhalten [446-454]. Im Gegensatz dazu stieg die "Fluidität" der Plasmamembran nach A β Behandlung, wenn Pyren als Fluoreszenzsonde für die Anisotropiemessung verwendet wurde [455-457]. Hieraus lässt sich schließen, dass die verwendete Fluoreszenzsonde ursächlich für die gegensätzlichen Ergebnisse ist. Strukturell unterscheiden sich DPH und Pyren, was Einfluss auf ihr Verhalten innerhalb der Membran haben muss. Somit zeigen die beiden Fluoreszenzsonden A β Effekte in unterschiedlichen Membranumgebungen an. Interessanterweise wird bei der Verwendung von DPH und TMA-DPH derselbe A β Effekt erzielt, obwohl sich die Lage dieser beiden Fluoreszenzsonden innerhalb der Membran ebenfalls unterscheidet. DPH interkaliert entweder längs oder quer zu den Acylketten innerhalb des hydrophoben Bereichs der Membran, wohingegen TMA-DPH im Kopfgruppenbereich (hydrophiler Teil) fest verankert ist [441].

Anisotropiemessungen mit DPH führen abhängig von der untersuchten Membran zu unterschiedlichen Ergebnissen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein A β ₁₋₄₂-induzierter Rückgang der Anisotropie beobachtet, wohingegen DPH interkaliert in die Plasmamembran in Anwesenheit von A β Peptiden zu einem Anstieg der Anisotropie führt [446-454]. Da die Ordnung und Dynamik der Lipidphase durch den Protein- und Cholesterolanteil beeinflusst wird, dürften Unterschiede in der Zusammensetzung dieser beiden biologischen Membranen der wahrscheinlichste Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse sein. In der Plasmamembran finden sich im Gegensatz zur IMM Spingolipide und Cholesterol, indessen wird Cardiolipin ausschließlich in der IMM gefunden [461]. Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden biologischen Membranen in ihrem Proteinmassenanteil (ca. 50% in der Plasmamembran und ca. 80% in der IMM).

5.3.6 A β ₁₋₄₂ induzierte Änderungen des Proteoms

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden A β ₁₋₄₂-induzierte Änderungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels (siehe 5.3.4) und des mitochondrialen Membranpotenzials (siehe 5.3.5) identifiziert. Ob diese Änderungen etwas mit einem fehlerhaften Zusammenbau der Atmungskettenkomplexe, etwa durch die Abwesenheit einiger Untereinheiten, zu tun hat, sollte mittels einer quantitativen Proteomanalyse ermittelt werden. Dafür wurden 120 μ g Mitochondrienproteine aus OLN-93 und SH-SY5Y in einer 2D-BN/SDS-PAGE separiert (siehe 4.21.3). Um Proteine innerhalb eines 2D-Gels quantifizieren zu können, müssen sie mit einem Farbstoff angefärbt werden, der sowohl einen weiten linearen als auch quantitativen Proteinkonzentrationsbereich aufweist. Der Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Ruby besitzt diese Eigenschaften [250, 293] und wurde daher zur Proteinfärbung eingesetzt (siehe 4.26.3). Gelbilder, auf denen kein Proteinspot ein übersättigtes Fluoreszenzsignal zeigte, wurden dann für die Quantifizierung des mitochondrialen Proteoms mittels der Software Delta2D verwendet (siehe 4.27, repräsentative Gelbilder siehe 7.12 A).

Im ersten Schritt wurden identische Proteinspots auf unterschiedlichen Gelbildern beim sogenannten *Warping* zur Deckung gebracht. Bei diesem Vorgang war es besonders wichtig präzise zu arbeiten, denn nur durch eine exakte Überlagerung der Gelbilder kann ein Fusionsgel mit hoher Qualität entstehen, das Grundlage für die Quantifizierung ist. Besonders bei den OLN-93 Proben gab es große Gel-zu-Gel-Variationen, die das *Warping* erschwerten und somit die Qualität des Fusionsgels minderten. Auf dem Fusionsgel wurden die zu quantifizierenden Proteinspots markiert (siehe 7.12 B). Proteinspots, deren Spotgrenzen nicht eindeutig definiert waren, wurden ebenfalls markiert und in den Hintergrund gebracht. Sie dienten der Ermittlung der Gesamtproteinmenge auf dem Gel. Für OLN-93 Proben wurden insgesamt 42 Proteinspots markiert und für SH-SY5Y 46. Da das Auflösungsvermögen mittlerer 2D-Gele begrenzt ist, führte dies in Kombination mit den Gel-zu-Gel-Variationen zu einer eher geringen Anzahl an Proteinspots, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit quantitativ analysiert werden konnten (im Vergleich zu 2D-Gelen mit isolierten Mitochondrien aus Geweben von z.B. Rind, Maus und Ratte [277, 311]).

Im letzten Schritt quantifizierte die Software die Grauwerte aller Pixel innerhalb einer jeden Spotmarkierung als absolutes Grauwertpixelvolumen V eines jeden Spots. Im Hintergrund wurde gleichzeitig das totale absolute Grauwertvolumen kalkuliert. Der Quotient aus dem absoluten Grauwertpixelvolumen V und dem totalen absoluten Grauwertvolumen ergab das relative Grauwertpixelvolumen $V\%$ für jeden Spot. Da $V\%$ direkt proportional zur Proteinmenge eines Spots ist, konnte darüber der Einfluss von A β ₁₋₄₂ Peptiden auf das mitochondriale Proteom untersucht werden (Details zur Quantifizierung siehe 4.27).

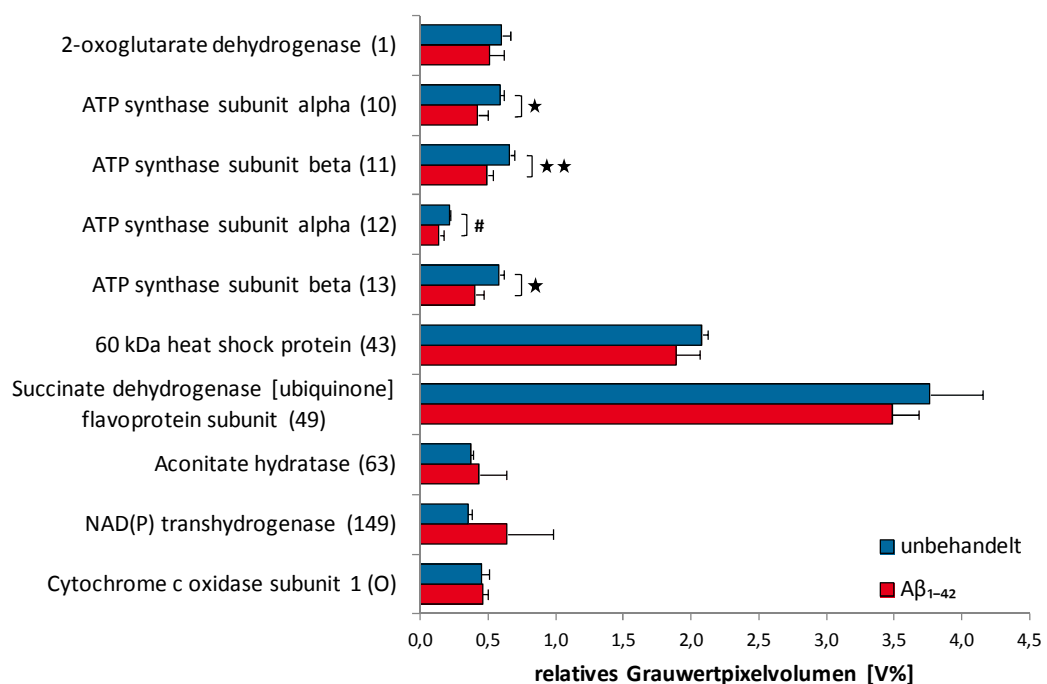
Für OLN-93 Proben wurden zehn mitochondriale Proteine quantifiziert (siehe Abb. 68A, Identifizierung von Proteinspots siehe 5.2.3). Signifikante A β ₁₋₄₂-induzierte Änderungen gab es für die ATP Synthase in ihrer monomeren und dimeren Form. Die Proteinmengen der α - und β -Untereinheiten (Nr. 10 bis 13) waren zwischen 24,9 und 33,9% verringert. Darüber hinaus zeigten sich nicht signifikante Tendenzen hin zu geringeren Proteinmengen bei der Flavoprotein Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase (Nr. 49), der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (Nr. 1) sowie dem Hitzeschockprotein Hsp60 (Nr. 43, siehe dazu auch 7.12 C). Im

Gegensatz dazu wurden für die Aconitase (Nr. 63) und die NAD(P)-Transhydrogenase (Nr. 149) nicht signifikante Tendenzen hin zu einer größeren Proteinmenge gefunden. Die Proteinmenge der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 veränderte sich durch A β ₁₋₄₂ im Rahmen der Fehlertoleranz nicht.

Die Quantifizierung von 15 mitochondrialen Proteinen in SH-SY5Y Proben ergab fünf signifikante A β ₁₋₄₂-induzierte Änderungen (siehe Abb. 68B). Die Proteinmengen der α - und β -Untereinheit von Komplex V Dimer (Nr. 10 und 11) nahmen durch A β ₁₋₄₂ zu (+19,0% und +16,1%), sowie die der γ -Untereinheit Komplex V Monomer (Nr. 33, +41,1%). Die Flavoprotein Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase (Nr. 49) verzeichnete eine schwach signifikante Zunahme der Proteinmenge (+19,7%), wohingegen die Proteinmenge des Hitzeschockproteins Hsp60 (Nr. 43) schwach signifikant abnahm (-10,4%). Alle weiteren analysierten Proteine zeigten nicht signifikante Tendenzen. Für Komplex V Monomer nahm die Proteinmenge der α - und β -Untereinheit (Nr. 12 und 13) ab, die der b- und O-Untereinheit (Nr. 35b und 39) jedoch zu. Beim dimeren Komplex V vermehrte sich die Proteinmenge der γ - und O-Untereinheit (Nr. 31 und 41), wohingegen sich die der B1-Untereinheit (Nr. 40) verringerte. Bei der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 zeigte sich eine Abnahme der Proteinmenge. Bei den analysierten Proteinen des Citratzyklus (α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, Nr. 1 und Aconitase, Nr. 63) schien A β ₁₋₄₂ im Rahmen der Fehlertoleranz keinen Einfluss auf die Proteinmenge zu haben (siehe dazu auch 7.12 C).

Besonders auffällig war, dass A β ₁₋₄₂ in den beiden Zelllinien einen gegensätzlichen Einfluss auf die analysierten Untereinheiten von Komplex II und V (Nr. 10, 11 und 49) hatte. Hier scheinen sich Oligodendrozyten von Neuronen zu unterscheiden. Es könnte sich aber auch um einen Unterschied zwischen Ratte und Mensch handeln.

A OLN-93



B SH-SY5Y

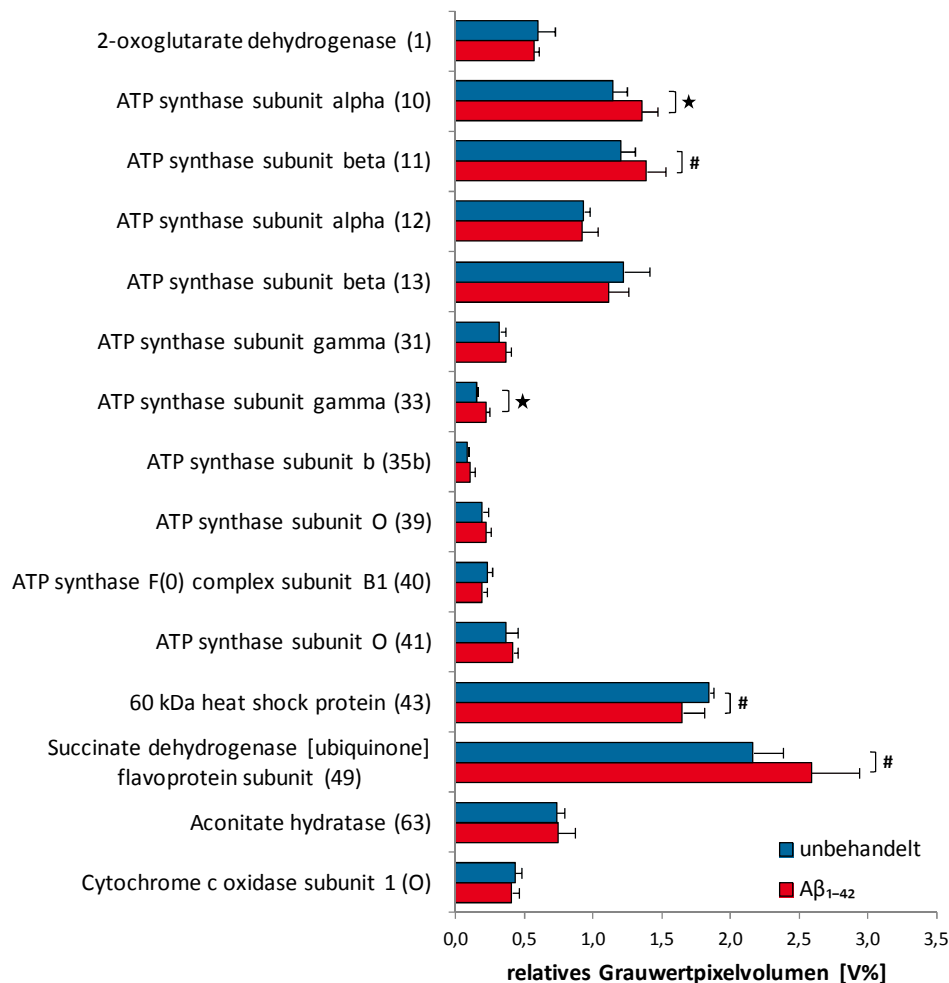


Abb. 68: Aβ₁₋₄₂-induzierte Änderungen der Proteinmenge mitochondrialer Proteine von (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y Zellen. Proteinspots in 2D-Gelen wurden mittels der Software Delta2D quantitativ analysiert. Es wurden für OLN-93 Proben vier und für SH-SY5Y Proben fünf signifikante Änderungen gefunden. (n=3 für OLN-93 und n=4 für SH-SY5Y, MW ± Stabw, ★★: p ≤ 0,01, ★: p ≤ 0,05, #: p ≤ 0,01)

Chou et al. [462] analysierten das mitochondriale Proteom des Cerebralcortex von 3-fach transgenen Mäusen (APP_{swe}, PS1_{M146V} und Tau_{P301L}) ebenfalls anhand der Quantifizierung von Proteinspots in 2D-Gelen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die SH-SY5Y Proben (Nr. 35b und 39) erhielten sie ebenfalls eine Zunahme der Proteinmengen für die Untereinheiten d und O von Komplex V Monomer. Für die Proteinmenge der β-Untereinheit von CV Monomer fanden sie eine Steigerung, die in SH-SY5Y Proben nur für die β-Untereinheit von Komplex V Dimer (Nr. 11) beobachtet wurde. Da die 2D-Gele von Chou et al. lediglich Informationen bis zu dem Bereich von knapp über 1 MDa in der 1. Dimension lieferten, können hier keine Vergleiche bezüglich von Komplex V Dimer getroffen werden. Unterschiede in den Ergebnissen könnten sich allerdings auch durch die verwendete Methode zur Proteinfärbung ergeben haben. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine mit SYPRO® Ruby im Anschluss an die 2D-BN/SDS-PAGE gefärbt, wohingegen Chou et al. die Proteine vor der Gelelektrophorese mit Fluoreszenzfarbstoffen koppelten (*difference gel electrophoresis*, DIGE). Obwohl es sich bei beiden Proteinfärbungen um quantitative

Methoden mit einem weiten linearen Bereich handelt, können sich bei einzelnen Proteinen Abweichungen in den erhaltenen Fluoreszenzintensitäten ergeben (für einen Vergleich der beiden Färbemethoden siehe Kratochwil [311]). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass beide Farbstoffe unterschiedlich mit Proteinen wechselwirken. SYPRO® Ruby bindet nicht-kovalent sowohl an basische Aminosäuren als auch an das Peptidrückgrat [292]. Für DIGE wird hingegen eine kovalente Bindung zwischen 3% der Lysinreste und dem Fluorophor gebildet (sogenannte minimal Markierung) [350, 463]. Eine Zunahme der Proteinmenge der β -Untereinheit von Komplex V wurde allerdings auch durch die Quantifizierung von Proteinspots in 2D-IEF/SDS-Gelen unter Anwendung der DIGE Methode in Proben aus transgenen Mäusen beobachtet [462, 464]. Meines Wissens lässt sich anhand von Proteinspots auf 2D-IEF/SDS-Gelen jedoch keine Aussage darüber treffen, zu welchem Assemblierungszustand eines Atmungskettenkomplexes die betroffene Untereinheit gehört. Dementsprechend könnte es sein, dass eine Proteinzunahme erhalten wird, obwohl dies nicht für alle Assemblierungszustände zutrifft (wie sich z.B. in der vorliegenden Arbeit aus der Summe der beiden analysierten β -Untereinheiten von Komplex V für SH-SY5Y ein positiver Wert ergeben würde). Auch wenn durch 2D-IEF/SDS-DIGE einige interessante Informationen verloren gehen (z.B. Assemblierung zu Oligomeren bzw. Superkomplexen), wird diese Methode bevorzugt für die quantitative Proteomanalyse eingesetzt. Zum einen wegen der besseren Auflösung in der ersten Dimension (IEF) im Vergleich zur BN-PAGE und zum anderen wegen der Verminderung von Gel-zu-Gel-Variationen durch die gemeinsame Auftrennung zweier Proben (Behandlung und Kontrolle) innerhalb eines Gels mittels DIGE [349, 350, 465]. Häufig wird für die 1. Dimension sowohl eine BN-PAGE als auch eine IEF durchgeführt, weil dadurch sich ergänzende Ergebnisse erhalten werden.

Neben veränderten Proteinmengen für Komplex V beobachteten Chou et al. [462] in ihren transgenen Mäusen weitere Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen, deren Proteinmengen beeinflusst waren. Sie fanden verringerte Proteinmengen für die COX7a2 Untereinheit von Komplex VI sowie für die Komplex I Untereinheiten NDUAD, NDUA5, NDUA9 und NDUA6 (alle über 2D-BN/SDS-DIGE). Für die CI Untereinheit NDUV2 sowie für die CIII Untereinheit UCRI wurden vermehrte Proteinmengen erhalten (beide über 2D-IEF/SDS-DIGE). Untersuchungen an Cortizes von tg2576 Mäusen (APP^{KM670/671NL}) [466] ergaben vergleichbare Ergebnisse zu den veränderten Proteinmengen in den Untereinheiten NDUAD (CI, über 2D-BN/SDS-DIGE) und UCRI (CIII, über 2D-IEF/SDS-DIGE, Vergleich mit [462]). Zusätzlich wurden angestiegene Proteinmengen für die Untereinheiten NDUA2 (CI) und QCR7 (CIII) sowie verminderte Proteinmengen für die Untereinheiten NDUS4 (CI) und CY1 (CIII, mitochondrial codiert) gefunden (alle über 2D-BN/SDS-DIGE).

Bisher konnten schon einige Daten über A β ₁₋₄₂-induzierte Proteinmengenänderung verschiedener Untereinheiten von Komplex I, III und V erhalten werden (siehe [462, 464, 466] und die vorliegende Arbeit). Informationen zu CIV Untereinheiten sind jedoch selten. Wie bereits erwähnt fanden Chou et al. [462] eine Abnahme der Proteinmenge der COX7a2 Untereinheit von Komplex IV. In der vorliegenden Arbeit wurde für die COX1 Untereinheit lediglich eine Tendenz hin zu einer geringeren Proteinmenge in SH-SY5Y Proben gefunden.

In OLN-93 Proben änderte sich die Proteinmenge durch A β ₁₋₄₂ so gut wie nicht. Informationen über Komplex II Untereinheiten wurden in der Literatur nicht gefunden.

Eine vermehrte Proteinmenge von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe könnte auf kompensatorische Mechanismen hindeuten, wohingegen eine Verringerung viele mögliche Ursachen haben könnte. Auf der Ebene der DNA könnte A β ₁₋₄₂ die Genexpression dieser Untereinheiten herunter regulieren oder die DNA so schädigen (z.B. durch ROS-induzierte Oxidation), dass geschädigte DNA in Zellen akkumuliert. Diese Gefahr besteht besonders für mitochondrial codierte Proteine, weil die DNA-Reparaturmechanismen in den Mitochondrien nicht so effizient arbeiten wie im Nukleus [467]. Der Einfluss von Mutationen der mtDNA in AD Patienten ist jedoch ein kontroverses Thema [468-471]. Allerdings wurde für die mitochondrial codierten Untereinheiten von Komplex III und IV über die Analyse der mRNA eine vermehrte Genexpression in AD Patienten sowie transgenen AD Mäusen gefunden [472, 473]. In den gleichen Studien war die Genexpression mitochondrial codierter Komplex I Untereinheiten in AD Patienten vermindert (trotz großer Patient-zu-Patient-Variationen) [472], wohingegen sie in AD Mäusen erhöht war [473]. Für kerncodierte Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe fanden Brooks et al. [474] eine signifikant reduzierte Genexpression von NDUS4 (CI), UQCRC2 (CIII), COX4I1, COX6A1, COX6C (alle drei CIV) und ATP5B (CV). Exprimierte Untereinheiten könnten aber auch aufgrund von DNA-Schäden, die z.B. zu einer falschen Faltung führen, abgebaut werden. Posttranslationale Modifikationen (z.B. durch ROS-induzierte Oxidation) könnten ebenfalls in der Degradation betroffener Untereinheiten resultieren. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass kerncodierte Untereinheiten nicht in die Mitochondrien transportiert werden können, weil die Transportmechanismen durch A β ₁₋₄₂ blockiert werden [115, 150]. In diesem Fall sollte allerdings die Proteinmenge aller kerncodierten Untereinheiten abnehmen, wodurch sich größere Konsequenzen für die Zelle ergeben müssten. Da die Proteinmengen der untersuchten Proteine des Citratzyklus (Nr. 1 und 63) sowie der COX1 Untereinheit von Komplex IV (O) nur geringfügig von A β ₁₋₄₂ beeinflusst wurden, schien dies doch eher unwahrscheinlich. Aufgrund der A β ₁₋₄₂-vermittelten Verminderung der Proteinmenge des Hitzeschockproteins Hsp60 (Nr.43) ließ sich vermuten, dass es bei einigen in die Mitochondrien importierten Proteinen zu Faltungsproblemen gekommen war, die zu deren Degradation geführt haben. Eine Abnahme der Hsp60-Menge wurde auch von Takano et al. [464] in transgenen Mäusen beobachtet.

Chou et al. [462] fanden zudem in den Cerebralcortizes von 3xTg-AD Mäusen erhöhte Proteinmengen für einige Proteine des Citratzyklus (E1 vom Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, Isocitrat-Dehydrogenase, E2 vom α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex, Fumarase, Malat-Dehydrogenase), die auf einen hohen Energiebedarf hindeuten (alle über 2D-IEF/SDS-DIGE). Die Ergebnisse der Quantifizierung von Proteinen des Citratzyklus (E1 vom α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex, Nr. 1 und Aconitase, Nr. 63) ließen diese Schlussfolgerung im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht zu. Darüber hinaus scheint die Expression von fünf Genen, die am Citratzyklus beteiligt sind, in AD Patienten signifikant verringert [474]. Die betroffenen Gene codieren für Aconitase, Succinyl-CoA-Synthetase, Fumarase und Malat-Dehydrogenase.

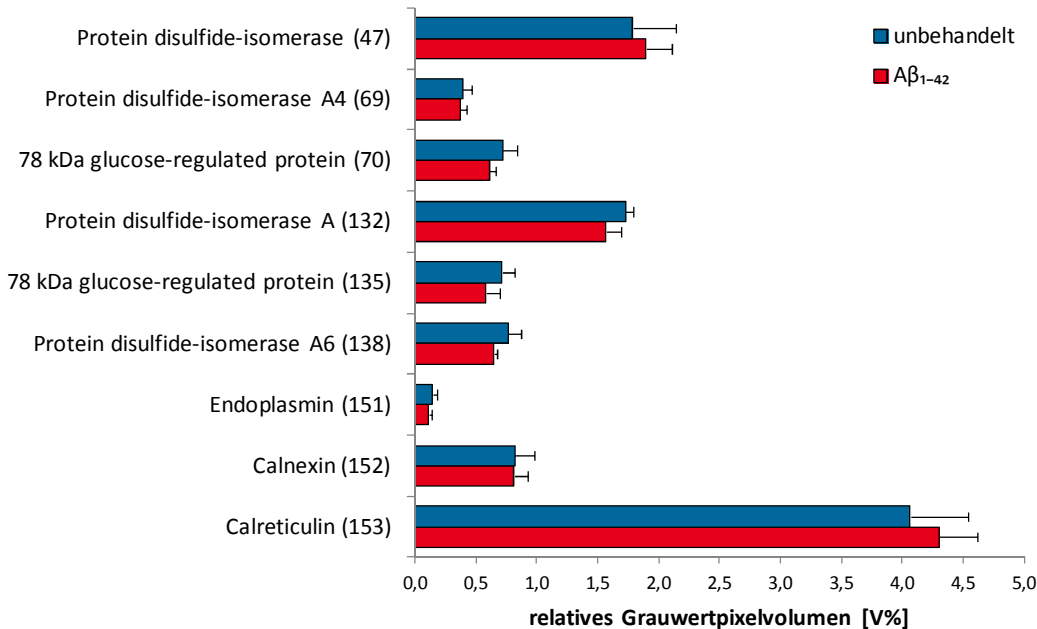
Die verschiedenen Studien zur Genexpression (siehe [472-474]) und der Proteinmenge (siehe [462, 464, 466] sowie die vorliegende Arbeit) stehen teilweise im großen Kontrast. Auf der einen Seite scheint sich A β ₁₋₄₂ zwar auf die Expression von Genen, die am Citratzyklus, an der oxidativen Phosphorylierung, sowie der ATP Synthese beteiligt sind, negativ auszuwirken, auf der anderen Seite führt es zu einer Erhöhung der Proteinmenge vieler Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe sowie den Proteinen des Citratzyklus. Hervorzuheben sind hier besonders die Fumarase, die Malat-Dehydrogenase und die β -Untereinheit von Komplex V, weil für diese Proteine Daten sowohl für die Genexpression als auch für die Proteinmenge existieren. Diese Diskrepanzen könnten auf die Untersuchung unterschiedlicher Gewebe (Hippocampus für Genexpression und Cortex für *steady-state* Proteinmenge) zurückzuführen sein. An dieser Stelle ist es aber auch von Interesse, ob sich die Aktivität dieser Proteine geändert hat, um so Aussagen darüber zu treffen, ob z.B. die Degradation dieser Proteine evtl. beeinträchtigt ist. Sowohl für die Fumarase als auch für die Malat-Dehydrogenase wurde in AD Cortices eine gesteigerte Aktivität gefunden [475]. Im Gegensatz dazu verringert sich die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes sowie der Isocitrat-Dehydrogenase [475-477]. Dies spricht dafür, dass der Glucosemetabolismus beeinträchtigt ist, wobei dies keine Auswirkung auf die oxidative Phosphorylierung haben muss. Durch die erhöhte Aktivität der Fumarase sowie der Malat-Dehydrogenase stehen wahrscheinlich trotzdem ausreichend Reduktionsäquivalente zur Verfügung, wenn vermehrt Fumarat aus dem Harnstoffzyklus und Succinyl-CoA aus der β -Oxidation dem Citratzyklus zugeführt werden. Der Vergleich von Genexpression und Proteinmenge in Kombination mit Enzymaktivität verdeutlicht, dass aus der Genexpression nicht eindeutig auf die in der Zelle tatsächlich vorhanden Proteine geschlossen werden kann und dass für genaue Aussagen eine Kombination von *steady-state* Proteinmenge und Enzymaktivität von großer Bedeutung ist.

Wie bereits erwähnt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Mitochondrienfraktion isoliert, die mit anderen Organellen "verunreinigt" war (siehe 5.2.3). Um die zellulären Auswirkungen des A β ₁₋₄₂ Peptids zu untersuchen, war dies jedoch eher von Vorteil, weil verschiedene Kompartimente analysiert werden konnten. So wurde für beide Zelllinien festgestellt, dass A β ₁₋₄₂ keine signifikanten Unterschiede in der Proteinmenge von ER-Proteinen verursachte (siehe Abb. 69). Von den neun für OLN-93 Proben quantifizierten Proteinmengen wiesen sechs (Proteindisulfidisomerase A4, Nr. 69+132; 78 kDa *glucose-regulated protein*, Nr. 70+135; Proteindisulfidisomerase A6, Nr. 138 und Endoplasmin, Nr. 151) eine Tendenz zu geringeren Werten und zwei zu höheren auf (Proteindisulfidisomerase, Nr. 47 und Calreticulin, Nr. 153). Calnexin (Nr. 152) zeigte keine Veränderung der Proteinmenge. Im Gegensatz zu OLN-93 nahm die Proteinmenge von 78 kDa *glucose-regulated protein* (Nr. 70+135) sowie von der Proteindisulfidisomerase A6 (Nr. 138) für SH-SY5Y Proben zu. In Übereinstimmung mit OLN-93 wurde eine geringere Endoplasminmenge (Nr. 151) gefunden. (siehe dazu auch 7.12 C).

In der Literatur sind keine A β ₁₋₄₂-induzierten Änderungen der Proteinmenge von ER-Proteinen sowie deren Genexpression beschrieben. Im Rahmen der Fehlertoleranz wurden auch in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede der Proteinmengen zwischen A β ₁₋₄₂-be-

handelten und unbehandelten Proben beobachtet (Nr. 47, 69, 152,153 für OLN-93 und Nr. 70, 135, 138, 151 für SH-SY5Y). Demzufolge scheint es so, als hätte A β ₁₋₄₂ keinen Einfluss auf ER-Proteine.

A OLN-93



B SH-SY5Y

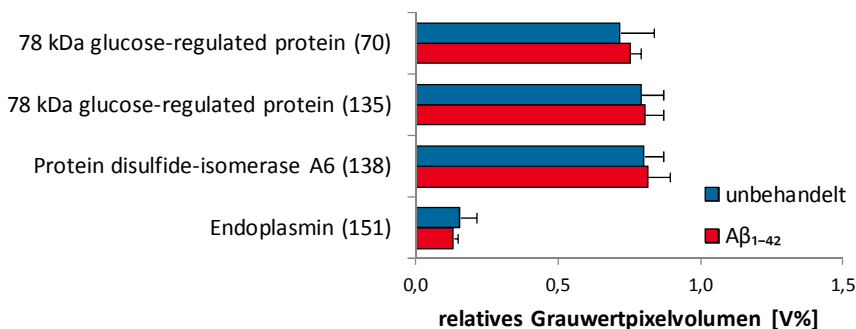


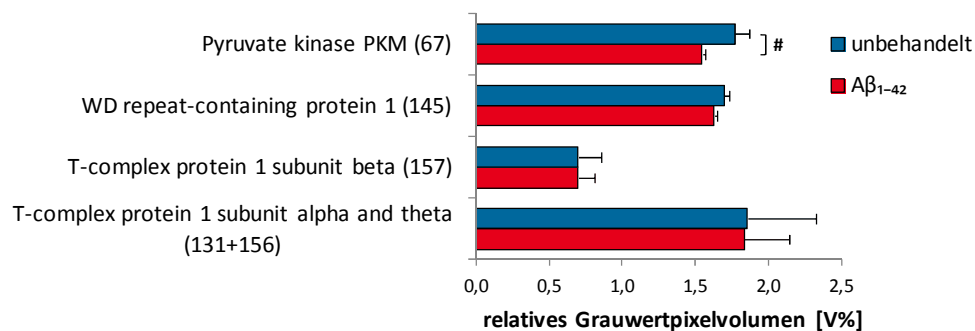
Abb. 69: A β ₁₋₄₂-induzierte Änderungen der Proteinmenge von Proteinen des endoplasmatischen Reticulums in (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y Proben. Proteinspots in 2D-Gelen wurden mittels der Software Delta2D quantitativ analysiert. Für beide Zelllinien wurden keine signifikanten Änderungen gefunden. (n = 3 für OLN-93 und n = 4 für SH-SY5Y, MW \pm Stabw)

Die quantitative Analyse cytosolischer Proteine beschränkte sich auf drei Proteine: Pyruvatkinase (Nr. 67), *WD repeat-containing protein 1* (Nr. 145) und *T-complex protein 1* (Nr. 131+156 und 157, siehe Abb. 70). Alle drei Proteine verhielten sich in beiden Zelllinien gegensätzlich im Bezug auf ihre A β ₁₋₄₂-induzierte Änderung der Proteinmenge. Die Pyruvatkinasemenge nahm durch A β ₁₋₄₂ in OLN-93 Proben schwach signifikant ab (-15,6%), hingegen nicht signifikant zu in SH-SY5Y Proben. In SH-SY5Y Proben zeigte sich eine hochsignifikante Zunahme der Proteinmenge von *WD repeat-containing protein 1* (+22,5%), in OLN-93 verringerte sich die Proteinmenge nicht signifikant. Die Proteinmenge der β -Untereinheit von *T-complex protein 1* veränderte sich in OLN-93 Proben nicht und die α -/ θ -Untereinheit zeigte lediglich eine geringfügige Abnahme. In SH-SY5Y Proben wurde eine

Verringerung der β -Untereinheit von *T-complex protein 1* gefunden sowie eine Zunahme der α -/ θ -Untereinheit. (siehe dazu auch 7.12 C).

Im Hippocampus von AD Patienten wurde eine geringere Expression von Genen beobachtet, die an der Glykolyse (Phosphofructokinase, Aldolase, Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglyceratkinase und Enolase) beteiligt sind [474]. Im Gegensatz dazu wurde wie bereits bei den Enzymen des Citratzyklus eine erhöhte Aldolasemenge im Cortex von AD Patienten gefunden [462]. Wie bereits erwähnt können diese Unterschiede wahrscheinlich auf die Untersuchung verschiedener Gewebe zurückzuführen sein. Informationen über die Pyruvatkinase bzw. deren Expression existieren in der Literatur nicht, weshalb hier keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob sich an diesem Punkt Oligodendrozyten von neuronalen Zellen unterscheiden.

A OLN-93



B SH-SY5Y

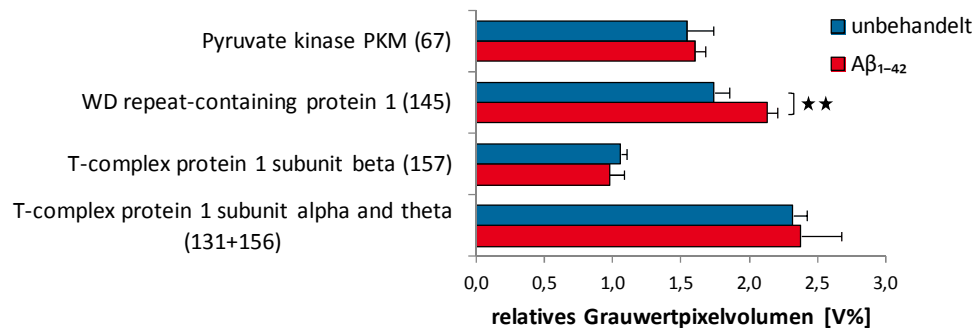


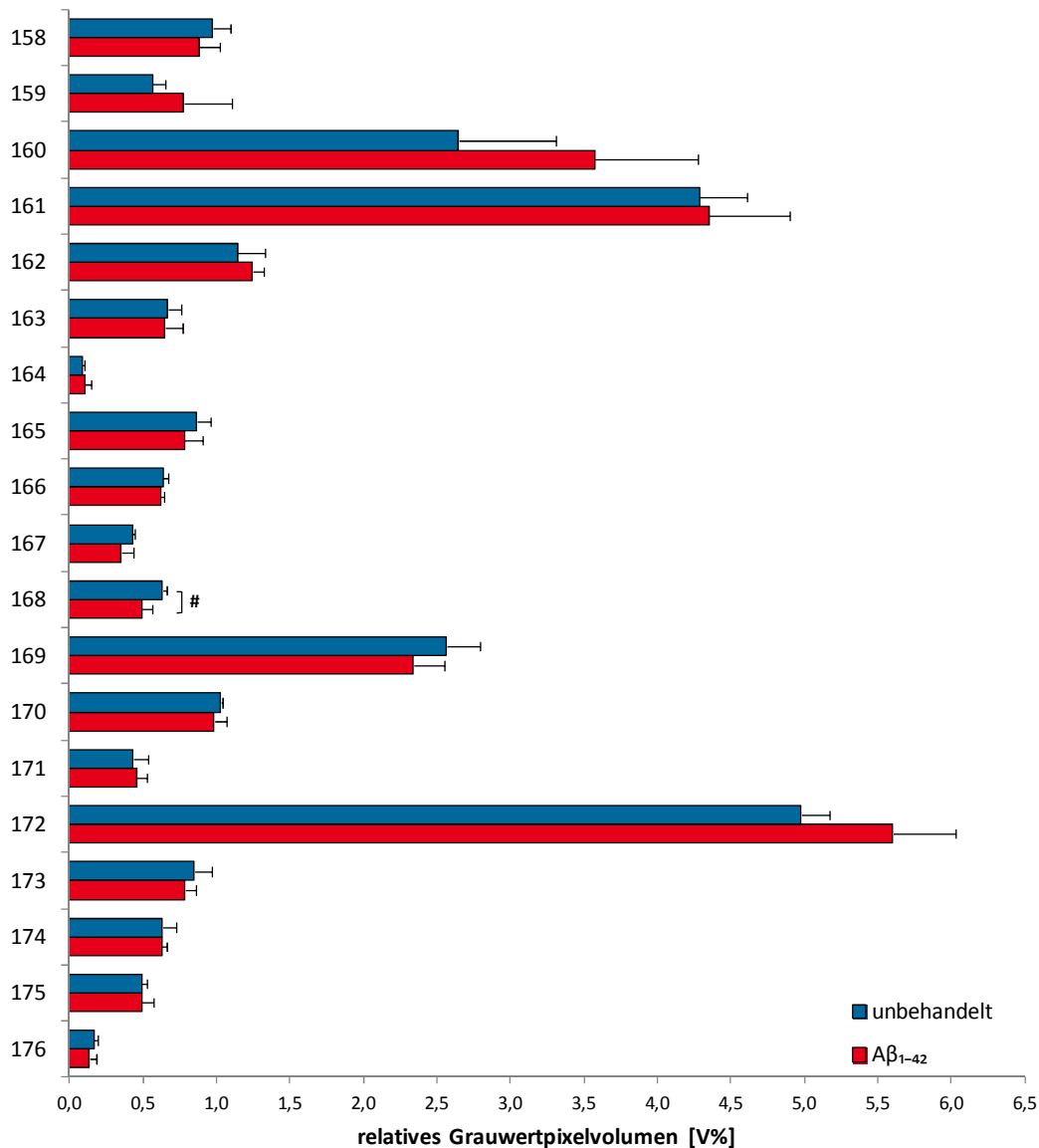
Abb. 70: A β ₁₋₄₂-induzierte Änderungen der Proteinmenge cytosolischer Proteine von (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y Zellen. Proteinspots in 2D-Gelen wurden mittels der Software Delta2D quantitativ analysiert. In beiden Zelllinien wurde jeweils eine signifikante Änderung gefunden. (n = 3 für OLN-93 und n = 4 für SH-SY5Y, MW \pm Stabw, ★★: p \leq 0,01, #: p \leq 0,01)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nur ein Teil der auf den 2D-Gelen befindlichen Proteinspots identifiziert werden (siehe 5.2.3). Dies führte in Kombination mit Gel-zu-Gel-Variationen dazu, dass auch bisher unbekannte Proteinspots quantifiziert wurden. Auch wenn die Proteinennamen und damit die zelluläre Funktion nicht bekannt sind, können hierdurch wichtige Informationen erhalten werden.

In OLN-93 Proben wurde für drei Proteine durch A β ₁₋₄₂ eine zunehmende Tendenz der Proteinmengen erhalten, für fünf Proteine gab es eine abnehmende Tendenz und für zehn Proteine blieben die Proteinmengen im Rahmen der Fehlertoleranzen gleich (siehe Abb. 71A). Lediglich für ein Protein (Nr. 168) wurde eine schwach signifikante Änderung detektiert

(-22,2%). Die Proteinmengen von sechs Proteinen zeigten eine ansteigende Tendenz in SH-SY5Y Proben, weitere vier stiegen signifikant an (Nr. 160, +22,0%; Nr. 169, +13,4%; Nr. 176, +84,7%; Nr. 178, +23,7%). Bei vier Proteinen verringerte sich die Proteinmenge signifikant (Nr. 162+163, -27,21%; Nr. 168, -25,5%; Nr. 174, -5,1%; Nr. 184, -41,9%), ein weiteres Protein zeigte eine verringerte Tendenz. Die Änderungen der Proteinmengen der Proteine 158, 160 und 168 verhielten sich in beiden Zelllinien ähnlich. Weitere Übereinstimmungen wurden nicht gefunden (siehe dazu auch 7.12 C).

A OLN-93



B SH-SY5Y

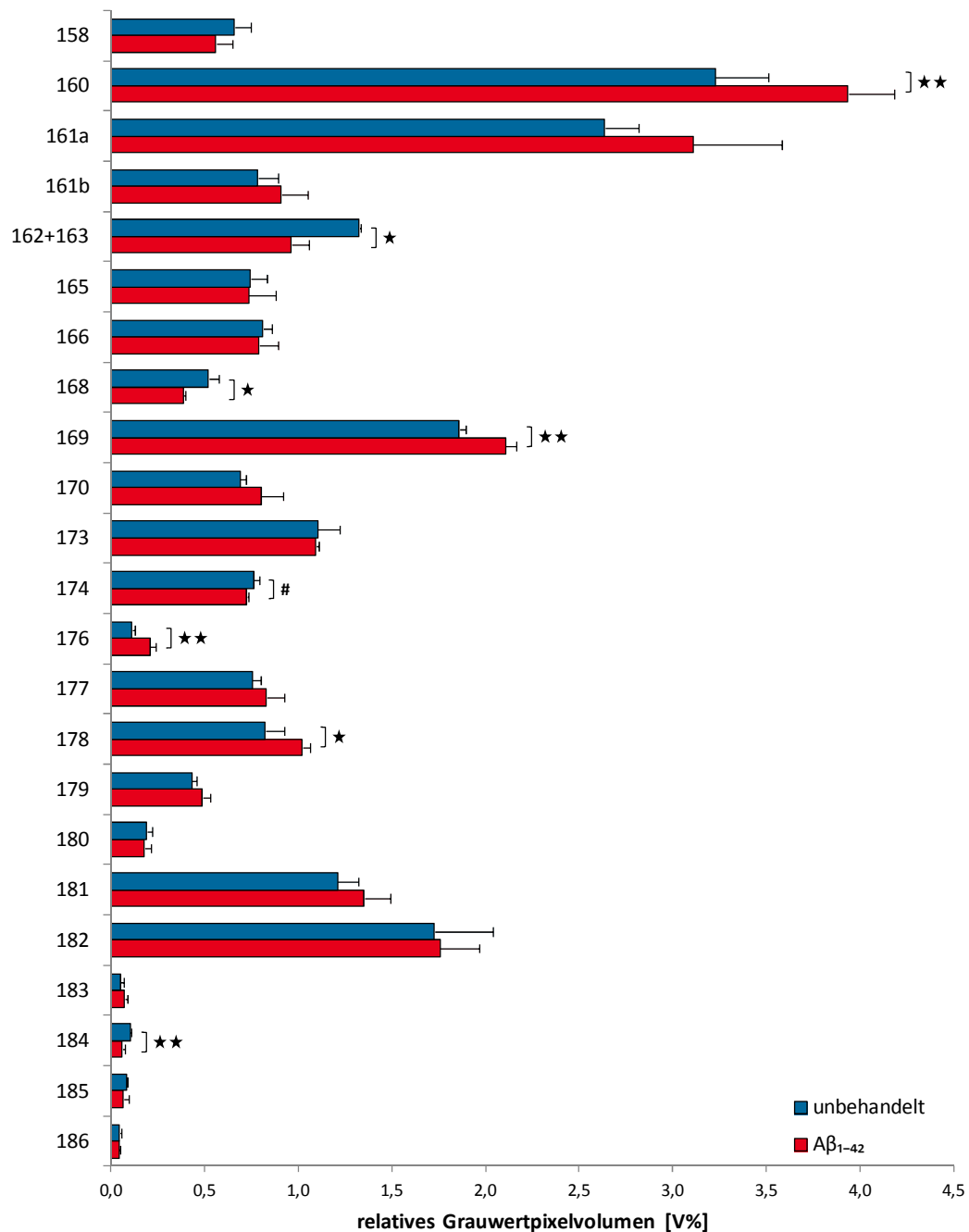


Abb. 71: Aβ₁₋₄₂-induzierte Änderungen der Proteinmenge nicht identifizierter Proteine von (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y Zellen. Proteinspots in 2D-Gelen wurden mittels der Software Delta2D quantitativ analysiert. Es wurden für OLN-93 Proben eine und für SH-SY5Y Proben acht signifikante Änderungen gefunden. (n=3 für OLN-93 und n=4 für SH-SY5Y, MW ± Stabw, **: p ≤ 0,01, *: p ≤ 0,05, #: p ≤ 0,01)

Es war relativ wahrscheinlich, dass es sich bei einem Teil der Proteine um mitochondriale Proteine handelte, denn obwohl die analysierte Mitochondrienfraktion mit dem ER und dem Cytosol "verunreinigt" war, wurden hauptsächlich Mitochondrienproteine identifiziert (siehe 5.2.3). Es hatte den Anschein, als würde Aβ₁₋₄₂ einen größeren Einfluss auf SH-SY5Y Zellen haben als auf OLN-93, weil mehr signifikante Unterschiede beobachtet wurden. Proteinspot 160 zeigte auch für OLN-93 eine eindeutige Tendenz, der Fehler war jedoch wahrscheinlich

aufgrund eines ungenauen *Warpings* sehr groß. Es wurde aber davon ausgegangen, dass bei einem kleineren Fehler ebenfalls eine signifikante Abnahme erzielt worden wäre. Da es sich bei Proteinspot 162+163 für SH-SY5Y um zwei Proteine handelt, die sich beide für OLN-93 im Rahmen der Fehlertoleranz nicht änderten, war es fraglich, ob ein reelles Ergebnis erzielt wurde oder ob es sich um ein Artefakt handelte. Die Proteinmenge von Proteinspot 168 nahm für beide Zelllinien etwa gleich ab (-22,2% für OLN-93 und -25,5% für SH-SY5Y), auch wenn sie sich im Signifikanzniveau unterschieden. Proteinspot 169 zeigte einen gegensätzlichen Einfluss des A β ₁₋₄₂ Peptids. Hier könnte es sich wieder um einen Unterschied zwischen Oligodendrozyten und neuronalen Zellen handeln (oder zwischen Ratte und Mensch). Für SH-SY5Y nahm die Proteinmenge von Proteinspot 174 schwach signifikant ab und die für Proteinspot 176 hochsignifikant zu. Beide Proteinspots änderten sich für OLN-93 nicht. Es wurden noch zwei weitere signifikante Änderungen für SH-SY5Y gefunden (Nr. 178 und 184), diese Proteinspots konnten für OLN-93 allerdings nicht im Fusionsgel markiert werden und waren somit nicht analysierbar.

Insgesamt wurden in OLN-93 Proben für sechs der 42 analysierten Proteinspots (14,3%) signifikante, A β ₁₋₄₂-induzierte Änderungen der Proteinmengen gefunden. In SH-SY5Y Proben wurden insgesamt 46 Proteinspots untersucht, von denen 14 (30,4%) eine geänderte Proteinmenge anzeigten (siehe Abb. 72 und Tab. 29). Diese Quote hielt dem Literaturvergleich stand. Chou et al. [462] detektierten in 2D-BN/SDS-Gelen acht Proteinspots mit geänderten Proteinmengen und in 2D-IEF/SDS-Gelen 28, wobei sie die Gesamtzahl der analysierten Proteinspots nicht angaben. Gillardon et al. [466] fanden auf ihren 2D-Gelen etwa 1200 Proteinspots. Es ist nicht bekannt, ob alle Spots quantifiziert wurden, aber signifikante Proteinmengenänderungen fanden sie lediglich für sechs (2D-BN/SDS-DIGE) bzw. fünf (2D-IEF/SDS-DIGE) Proteine. Takano et al. [464] analysierten in 2D-IEF/SDS-Gelen 74 Proteinspots und identifizierten so 20 Proteine mit geänderter Proteinmenge (27,0%).

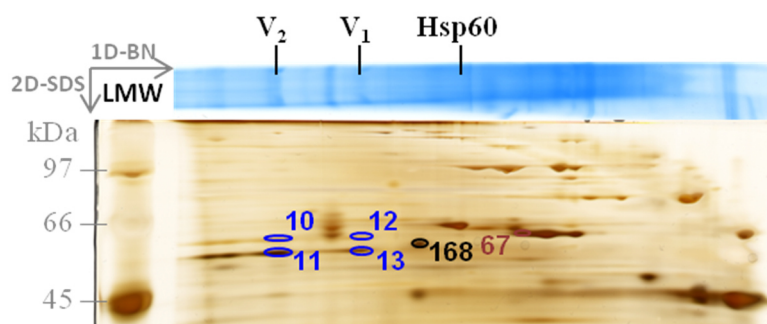
Der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Zelllinien wurde dabei in der β -Untereinheit von Komplex V Monomer beobachtet. A β ₁₋₄₂ wirkte sich demzufolge in Oligodendrozyten anders auf Komplex V aus als in Neuronen, was auf zelltypische Mechanismen hindeutete.

Tab. 29: Signifikante A β ₁₋₄₂-induzierte Änderungen von Proteinmengen in OLN-93 und SH-SY5Y Zellen. Die Abkürzung "n. a." steht für nicht auswertbar.

		OLN-93		SH-SY5Y	
Nr.	Proteinname	Änderung [%]	p-Wert	Änderung [%]	p-Wert
Mitochondriale Proteine					
49	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	-	-	+19,66	0,094
10	ATP synthase subunit alpha	-27,55	0,039	+19,01	0,033
11	ATP synthase subunit beta	-24,94	0,008	+16,07	0,069
12	ATP synthase subunit alpha	-33,88	0,051	-	-
13	ATP synthase subunit beta	-30,09	0,021	-	-
33	ATP synthase subunit gamma	-	-	+41,08	0,038
43	60 kDa heat shock protein	-	-	-10,42	0,085

		OLN-93		SH-SY5Y	
Nr.	Proteinname	Änderung [%]	p-Wert	Änderung [%]	p-Wert
Cytosolische Proteine					
67	Pyruvate kinase PKM	-12,68	0,091	-	-
145	WD repeat-containing protein 1			+22,45	0,003
Nicht identifizierte Proteine					
160		-	-	+22,02	0,009
162		-	-	-27,21	0,019
+163					
168		-22,16	0,057	-25,49	0,014
169		-	-	+13,37	0,001
174		-	-	-5,06	0,094
176		-	-	+84,67	0,007
178		n. a.	-	+23,72	0,025
184		n. a.	-	-41,89	0,005

A OLN-93



B SH-SY5Y

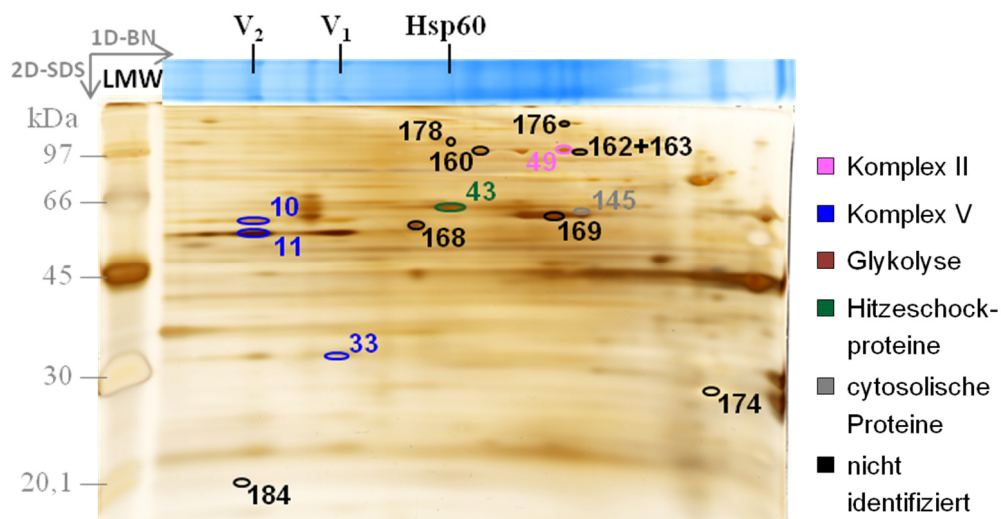


Abb. 72: Signifikante $A\beta_{1-42}$ -induzierte Änderungen von Proteinmengen in (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y Zellen. Proteine, deren Proteinmengen durch $A\beta_{1-42}$ beeinflusst wurden, sind in 2D-Gelen markiert. Details können Tab. 29 entnommen werden.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Alzheimer Demenz ist die häufigste Form der Demenzerkrankungen. Kognitive Funktionen gehen im Krankheitsverlauf unwiederbringlich durch langsam fortschreitende Neurodegeneration verloren [12]. Die stetig wachsende Anzahl an Alzheimerpatienten sind mit erheblichen finanziellen und sozialen Belastungen für die Gesellschaft verbunden [11, 12]. Daher sind die Entwicklung von Präventionsmöglichkeiten sowie Therapien dringend erforderlich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen des A β ₁₋₄₂ Peptids auf Neuronen (SH-SY5Y) und Oligodendrozyten (OLN-93) untersucht. A β Peptide entstehen posttranslational aus dem amyloiden Vorläuferprotein APP, ein Typ I Transmembranprotein [28]. Intraneuronal vorkommende A β Mono- und Oligomere (Di- und Trimere sowie höhere Oligomere) scheinen dabei die pathogene Form des Peptids zu sein [3-7], denn im humanen Gehirn werden hauptsächlich A β Dimere [100] der Isoform A β ₁₋₄₂ [101] gefunden. Infolge der A β Neurotoxizität kommt es zu neuronalen Dysfunktionen vornehmlich der Synapsen, die zum Zelltod führen [3]. Da die in den Synapsen konzentrierten Mitochondrien bereits in der sehr frühen Phase der AD Pathogenese Dysfunktionen aufweisen [10], fokussierte sich die vorliegende Studie auf Mitochondrien, um deren signifikante Funktion in der Anfangsphase der AD Pathogenese zu charakterisieren. Denn nur so wird es möglich sein, Präventionsmöglichkeiten oder Therapieansätze für diese bislang unheilbare Krankheit zu entwickeln.

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y und die Ratten-Oligodendrozytenzelllinie OLN-93 mit 2,0 μ M disaggregiertem A β ₁₋₄₂ Peptid für 24 h behandelt. Das extern applizierte Peptid wurde intrazellulär mittels Konfokalmikroskopie lokalisiert. Anschließend wurden Auswirkungen auf die Zellphysiologie, den oxidativen Stress, den Energiestoffwechsel, die mitochondrialen Membranen sowie das Proteom analysiert.

Nach 5-stündiger Inkubationszeit wurden extern applizierte A β ₁₋₄₂ Peptide (fluoreszenzmarkiert) in späten Endosomen (siehe Abb. 50) und nach 16 h auch in Mitochondrien gefunden (siehe Abb. 51). Daher wird postuliert, dass die Aufnahme des Peptides über Endozytose erfolgt.

Tab. 30 listet alle Auswirkungen des A β ₁₋₄₂ Peptids auf OLN-93 und SH-SY5Y Zellen auf, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhalten wurden. Am auffälligsten ist der große Anstieg (>100%) der zellulären ROS Menge (siehe Abb. 55). A β ₁₋₄₂ induziert entweder auf verschiedene Weisen die Generierung von ROS oder stört Antioxidationsmechanismen. Oxidativer Stress ist die Folge, der sehr wahrscheinlich in Proteinoxidationen, Lipidperoxidationen sowie DNA-Schäden resultiert. Interessanterweise entstanden durch A β ₁₋₄₂ mehr ROS als durch die selektive Inhibition von Komplex IV. ROS scheint somit ein wichtiger Faktor bei der AD Pathogenese vermittelt durch A β ₁₋₄₂ Peptide zu sein.

Überraschend ist jedoch, dass trotz des großen Anstiegs an ROS nur wenige Proteinoxidationen innerhalb der Mitochondrien von A β ₁₋₄₂-behandelten Zellen detektiert wurden (siehe Abb. 56). Die meisten mitochondrialen Proteine weisen somit keine A β ₁₋₄₂-induzierte Proteinoxidation auf, wohingegen wenige Proteine wahrscheinlich zu 100% oxidiert sind, was sich

auf deren Funktion auswirken dürfte. Es wird deshalb vermutet, dass Komplex I und Komplex II oxidierte Untereinheiten enthalten, weil deren spezifische Aktivitäten beeinträchtigt waren (siehe Abb. 60 und Abb. 61). ROS-induzierte Lipidperoxidationen können ebenfalls zur Aktivitätsminderung beitragen [478]. In A β ₁₋₄₂-behandelten SH-SY5Y Proben wurde eine vermehrte Proteinmenge der CII Untereinheit SDHA gefunden (siehe Abb. 68B). Dies kann darauf hindeuten, dass SH-SY5Y Zellen einen CII Aktivitätsverlust durch eine gesteigerte Expression von CII Untereinheiten zu kompensieren versuchen. ROS-vermittelte Defizite an den Atmungskettenkomplexen verursachen wahrscheinlich weitere ROS, was den hohen Wert für die zelluläre ROS Menge in A β ₁₋₄₂-behandelten Zellen erklären dürfte. Somit befinden sich ROS Generierung und Schäden an Komplex I und Komplex II in einem fatalen Kreislauf, in dem das eine zum anderen führt und umgekehrt. Interessant ist die gefundene A β ₁₋₄₂-induzierte Aktivitätssteigerung von Komplex IV (siehe Abb. 62). Untereinheiten von Komplex IV können ebenfalls von Oxidationen betroffen sein und/oder Lipidperoxidationen beeinflussen deren Aktivität. Es wird angenommen, dass durch A β ₁₋₄₂ entweder wie bei Komplex II die Proteinmenge von CIV Untereinheiten zunimmt oder dass sich Komplex IV vermehrt in Superkomplexen assembliert. Beides sind Kompensationsmechanismen, um einen Mangel (z.B. Defizite im Protonengradient) auszugleichen.

Verringerte Aktivitäten von Atmungskettenkomplexen legen nahe, dass das mitochondriale Membranpotenzial durch A β ₁₋₄₂ ebenfalls beeinflusst wird. Auch wenn das MMP in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten Proben signifikant abnahm (siehe Abb. 66), scheinen sich daraus keine fatalen Konsequenzen für die Zelle zu ergeben. Eine Depolarisation des MMP vermag die *mitochondrial permeability transition pore* zu öffnen. Dies führt zur Freisetzung von Apoptoseinduktionsfaktoren wie Cyt c, die wiederum die Apoptosekaskade auslösen [479-481]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden allerdings keine Hinweise auf eine vermehrte Apoptose in A β ₁₋₄₂-behandelten Zellen gefunden. Die Verringerung des MMP kann aber auch mit einer vermehrten Lipidperoxidation in A β ₁₋₄₂-behandelten Zellen zusammenhängen, weil die Membran durch Lipidperoxidationen permeabler für Substanzen wird, die normalerweise die Membran nicht überqueren können [145].

Bei der Untersuchung des MMP verhielten sich Zellen, die mit dem Kontrollpeptid A β ₄₂₋₁ behandelt wurden, nicht wie unbehandelte Zellen (auf alle anderen im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen hat A β ₄₂₋₁ keinen Einfluss). Das MMP wurde durch A β ₄₂₋₁ in einem geringeren Ausmaß vermindert als durch A β ₁₋₄₂. Dies spricht dafür, dass das MMP nicht ausschließlich wegen geringerer Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe beeinträchtigt ist, sondern z.B. auch durch die Ausbildung von Poren/Kanälen in der Mitochondrienmembran [155, 156, 482]. Der hydrophobe Teil des A β Peptides scheint dabei direkt mit der Membran zu wechselwirken, egal ob er in der Aminosäuresequenz C-terminal wie beim A β ₁₋₄₂ Peptid oder N-terminal wie beim A β ₄₂₋₁ Peptid angeordnet ist.

Änderungen des MMP haben direkte Auswirkungen auf die ATP Synthese, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt werden konnten. Es wurden trotzdem Hinweise auf die A β ₁₋₄₂-induzierten Auswirkungen auf die ATP Synthese über die Proteinmengen der CV Untereinheiten erhalten. In A β ₁₋₄₂-behandelten SH-SY5Y Zellen wurden vermehrte Proteinmengen der α - und β -Untereinheiten von Komplex V Dimer sowie der γ -Untereinheit von

Komplex V Monomer gefunden (siehe Abb. 68), die darauf hindeuten, dass eine wahrscheinlich verminderte spezifische Aktivität der ATP Synthase durch größere Mengen an ATP Synthase kompensiert werden soll. Hingegen ist für OLN-93 Zellen davon auszugehen, dass die spezifische CV Aktivität zum einen wegen der Verringerung des MMP sinkt und zum anderen wegen geringerer Proteinmengen der α - und β -Untereinheiten von Komplex V Monomer und Dimer. Die zelluläre ATP Konzentration sank in beiden Zelllinien durch $A\beta_{1-42}$ um ca. 15% (siehe Abb. 63). Dies ist aufgrund des teilweise gegensätzlichen Einflusses von $A\beta_{1-42}$ auf die Untereinheitenmenge von Komplex V in OLN-93 und SH-SY5Y Zellen durchaus nicht zu erwarten gewesen. Es wird daher davon ausgegangen, dass die Abnahme der zellulären ATP Konzentration in OLN-93 aus einer verringerten ATP Synthese aufgrund von geringeren Mengen an Komplex V sowie eines verminderten MMP resultiert. In SH-SY5Y Zellen könnte die ATP Synthese trotz erhöhter Proteinmengen an CV Untereinheiten beeinträchtigt sein, wenn die spezifische Aktivität z.B. durch Proteinoxidationen vermindert ist. Es ist aber auch denkbar, dass ein erhöhter ATP Verbrauch etwa für Reparaturprozesse ursächlich für den Rückgang der zellulären ATP Konzentration ist.

Anisotropiemessungen mit DPH an Mitochondrienmembranen (siehe Abb. 67) lieferten den Nachweis für den Einbau von $A\beta_{1-42}$ Peptiden in die Mitochondrienmembran. $A\beta_{1-42}$ Peptide bewirken eine Zunahme der "Fluidität" der Mitochondrienmembran. Eine "fluidere" Mitochondrienmembran erhöht die laterale und Rotationsdiffusionsbewegung von Membranproteinen wie z.B. der Atmungskettenkomplexe.

Änderungen in der Anisotropie können auf eine geänderte Lipidzusammensetzung (z.B. Einbau anderer Fettsäuren) der Mitochondrienmembran hinweisen. Cardiolipin, das ausschließlich in der IMM vorkommt, nimmt eine wichtige Funktion im Energiestoffwechsel der Zelle ein. Es wird für eine optimale Aktivität aller Atmungskettenkomplexe (CI [483-485], CII [486], CIII [483, 487, 488], CIV [489], CV [490, 491]) benötigt. Darüber hinaus scheint es die Stabilität von Superkomplexen zu beeinflussen [492-495]. Änderungen in der Lipidzusammensetzung, die die Cardiolipinmenge betreffen, hätten daher direkte Auswirkungen auf den Energiestoffwechsel. Darüber hinaus dürften besonders Cardiolipine, die reich an ungesättigten Fettsäuren sind, von Peroxidationen betroffen sein, weil Cardiolipine bevorzugt in den Bereichen um die Atmungskettenkomplexe lokalisiert sind, an denen hauptsächlich ROS generiert werden [496]. Oxydierte Cardiolipine sind an der Aktivitätsminderung von Komplex I, III und IV beteiligt, wobei der genaue Mechanismus nicht bekannt ist [484, 497, 498]. Zudem wird durch Cardiolipinoxidation die Superkomplexformierung beeinträchtigt [499]. Allerdings wäre zu erwarten, dass durch eine erhöhte Lipidperoxidation die "Fluidität" der Mitochondrienmembran abnimmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch das Gegenteil gefunden (siehe Abb. 67). Lipidperoxidationen scheinen somit keine wichtige Rolle zu spielen.

Tab. 30: Einfluss von A β ₁₋₄₂ Peptiden auf OLN-93 und SH-SY5Y Zellen. Signifikante Änderungen sind farbig markiert (rot für Abnahme und grün für Zunahme). P-Werte sind wie folgt dargestellt: ***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$, #: $p \leq 0,1$. Die Abkürzung "n. a." steht für nicht auswertbar.

		OLN-93		SH-SY5Y
Lysosomale Aktivität (Viabilität)	↓	-5,6%	=	+0,3%
Metabolische Aktivität (Viabilität)	↑	+11,5%	=	+2,9%
Apoptose/Nekrose	=	+1,6%	=	+0,4%
ROS (total)	↑	+124,2% (*)	↑	+176,6% (**)
Proteinoxidation (mitochondrial)	↑	+7,0%	↑	+5,2%
CI Aktivität	↓	-33,0% (#)	↓	-20,5% (**)
CII Aktivität	=	-0,3%	↓	-8,6% (**)
CIV Aktivität	↑	+15,2%	↑	+24,7% (**)
ATP Konzentration (total)	↓	-15,5% (***)	↓	-15,2% (*)
MMP (mitochondrial)	↓	-31,8% (**)	↓	-32,7% (**)
Anisotropie (mitochondrial)	↓	-7,8% (***)	↓	-6,7% (***)
Proteom (ausgewählte Ergebnisse)				
SDHA	↓	-7,5%	↑	+19,7% (#)
ATPA (Dimer)	↓	-27,6% (*)	↑	+19,0% (**)
ATPB (Dimer)	↓	-24,9% (**)	↑	+16,1% (**)
ATPA (Monomer)	↓	-33,9% (#)	=	-1,7%
ATPB (Monomer)	↓	-30,1% (*)	↓	-9,1%
ATPG (Monomer)		n. a.	↑	+41,1% (*)
CH60	↓	-9,3%	↓	-10,4% (#)
KPYM	↓	-12,7% (#)	=	+3,6%
WDR1	↓	-4,0%	↑	+22,5% (**)
160	↑	+34,9%	↑	+22,0% (**)
162+163		n. a.	↑	+27,2% (*)
168	↓	-22,2% (#)	↓	-25,5% (*)
169	↓	-8,9%	↑	+13,4% (**)
174	=	-0,3%	↓	-5,1% (#)
178		n. a.	↑	+23,7% (*)
184		n. a.	↓	-41,9% (**)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von A β ₁₋₄₂ auf neuronale Zellen (SH-SY5Y) und Oligodendrozyten (OLN-93) untersucht. Zusätzlich wurden die Mengen verschiedener Proteine zwischen den beiden Zelltypen verglichen (siehe Abb. 45). Die auffälligsten Unterschiede wurden dabei für Komplex II und Komplex V der Atmungskette gefunden (siehe Abb. 45). Die Proteinmengen der α - und β -Untereinheiten von Komplex V Mono- und Dimer waren in OLN-93 Zellen geringer als in SH-SY5Y Zellen, wohingegen die SDHA Untereinheit von Komplex II höhere Proteinmengen aufwies. Hierbei könnte es sich um einen Unterschied im bevorzugten metabolischen Weg handeln. In OLN-93 Zellen

gibt es evtl. eine hohe Aktivität des Citratzyklus, an dem CII ebenfalls beteiligt ist. Neuronale Zellen haben einen hohen Energiebedarf und sind deshalb auf große ATP Syntheseraten angewiesen, die sich durch eine größere Menge an Komplex V steigern lässt.

Werden jeweils die unbehandelten Proben von OLN-93 und SH-SY5Y miteinander verglichen, fallen weitere Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien auf. SH-SY5Y wiesen im Vergleich zu OLN-93 Zellen ca. 20% mehr apoptotische/nekrotische Zellen (schwach signifikant, siehe Abb. 54) auf sowie mehr Proteinoxidationen (+20,0%, signifikant, siehe Abb. 56), eine höhere spezifische CIV Aktivität (+24,4%, signifikant, siehe Abb. 62) und eine höhere zelluläre ATP Konzentration (+9,3%, schwach signifikant, siehe Abb. 63). Hingegen wurden eine geringere spezifische CII Aktivität (-27,5%, signifikant, siehe Abb. 61) und Anisotropie (-14,0%, höchstsignifikant, Abb. 67) in SH-SY5Y Zellen gefunden. Die spezifische CI Aktivität war in beiden Zelllinien ähnlich (-6,0% in SH-SY5Y Zellen, nicht signifikant, siehe Abb. 60). Demzufolge resultieren die für OLN-93 gefundenen größeren Proteinmengen der CII Untereinheit SDHA tatsächlich in einer höheren Aktivität des Komplexes. Es wird davon ausgegangen, dass die in SH-SY5Y Zellen gefunden größeren Proteinmengen der CV Untereinheiten zu der größeren ATP Konzentration im Vergleich zu OLN-93 Zellen beitragen.

Prinzipiell hatten A β ₁₋₄₂ Peptide aber sehr ähnliche Auswirkungen auf beide Zelltypen. Aufgrund der größeren Menge an A β ₁₋₄₂ Peptiden, die in Mitochondrien von OLN-93 Zellen im Vergleich zu SH-SY5Y Zellen gefunden wurden (siehe Abb. 51), war dies nicht erwartet worden. In beiden Zelllinien hatte A β ₁₋₄₂ keinen Einfluss auf die Apoptose/Nekrose (siehe Abb. 54). Zelluläre ROS Mengen (siehe Abb. 55), Proteinoxidationen (siehe Abb. 56) und die spezifische CIV Aktivität (siehe Abb. 62) nahmen in beiden Zelllinien durch A β ₁₋₄₂ zu, wobei der Effekt in SH-SY5Y Zellen größer war als in OLN-93 Zellen (Ausnahme Proteinoxidation). A β ₁₋₄₂ bewirkte in beiden Zelllinien die Abnahme der spezifischen CI Aktivität (siehe Abb. 60), der zellulären ATP Konzentration (siehe Abb. 63), des MMP (siehe Abb. 66) sowie der Anisotropie (siehe Abb. 67). Mit Ausnahme der CI Aktivität (größerer A β ₁₋₄₂ Effekt in OLN-93 Zellen) waren die A β ₁₋₄₂ Effekte in beiden Zelltypen vergleichbar. Unterschiede gab es für die spezifische CII Aktivität (siehe Abb. 61) und die Proteinmengen der α - und β -Untereinheiten von Komplex V Dimer (siehe Abb. 68). In OLN-93 Zellen hatte A β ₁₋₄₂ keinen Einfluss auf die spezifische CII Aktivität, wohingegen sie in SH-SY5Y Zellen verringert war. Die Proteinmengen der α - und β -Untereinheiten von Komplex V Dimer wurden durch A β ₁₋₄₂ in OLN-93 Zellen verringert, SH-SY5Y Zellen zeigten höhere Proteinmengen derselben Untereinheiten nach A β ₁₋₄₂ Behandlung. Auffällig ist, dass von den untersuchten Proteinen in SH-SY5Y Zellen mehr Proteine durch A β ₁₋₄₂ hinsichtlich ihrer Proteinmengen beeinflusst wurden als Proteine in OLN-93 Zellen (14,3% in OLN-93 Proben und 30,4% in SH-SY5Y Proben). In OLN-93 Proben verringerte sich in allen Fällen die Proteinmenge, was auf Schäden an der für das entsprechende Protein codierenden DNA bzw. auf vermehrten Abbau eines exprimierten Proteins z.B. durch Fehlfaltung oder Proteinoxidation hindeutet. Neun der 13 Proteine, die in SH-SY5Y Proben durch A β ₁₋₄₂ beeinflusst wurden, wiesen größere Proteinmengen auf als unbehandelte Proben. Höhere Proteinmengen können entweder auf eine gesteigerte Genexpression zurückzuführen sein oder auf einen verringerten Abbau durch Stö-

rung der Degradationssysteme. Da es Hinweise dafür gibt, dass A β ₁₋₄₂ das Proteasom inhibiert [114], scheint ein verminderter Abbau ubiquitinierter Proteine denkbar. Eine Erhöhung der Genexpression als Kompensationsmechanismus ist aber auch nicht auszuschließen.

Dafür, dass OLN-93 größere Mengen an A β ₁₋₄₂ Peptiden aufnahmen als SH-SY5Y Zellen, waren die Auswirkungen des Peptids auf diese Zellen insgesamt moderat und vergleichbar mit denen von SH-SY5Y Zellen. OLN-93 scheinen somit resistenter gegenüber den Auswirkungen von A β ₁₋₄₂ Peptiden als SH-SY5Y Zellen. Die A β ₁₋₄₂ Toxizität scheint demzufolge vorwiegend auf neuronale Zellen zu wirken.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit blieben einige Fragen jedoch ungeklärt. Die Auswirkungen des A β ₁₋₄₂ Peptids auf die Proteinoxidation wurden zwar anhand des OxyBlotsTM untersucht, doch handelte es sich dabei um eine Methode, die eine quantitative Auswertung eines Western Blots beinhaltet. Da die Quantifizierung eines Western Blots immer mit Fehlern behaftet sein kann, sollte eine spektroskopische Methode zur Bestimmung von Proteinoxidationen gewählt werden, um eine verlässliche Quantifizierung sicherzustellen. Alternativ können detaillierte Informationen über den Oxidationszustand eines bestimmten Proteins mittels *redox proteomics* gewonnen werden. Dafür müssten Proteinspots sowohl von A β ₁₋₄₂-behandelten als auch von unbehandelten Proben in 2D-Gelen massenspektrometrisch analysiert werden. Darüber hinaus wäre es interessant Informationen über die mitochondriale Lipidperoxidation zu erhalten. Lipidperoxidationen können über sogenannte *lipid peroxidation end-products* nachgewiesen werden: zum einen über Malondialdehyd (MDA) im TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) Assay und zum anderen über 4-Hydroxynonenal (4-HNE), das am häufigsten durch Lipidperoxidation entsteht [500-502]. Der Identifizierung von 4-HNE kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, weil es durch die Oxidation von Lipiden mit mehrfach ungesättigten ω -6 Acylgruppen, wie sie z.B. in Arachidon- und Linolsäuren vorkommen, generiert wird [503]. Über 4-HNE können so indirekte Aussagen über den Oxidationsstatus von Cardiolipin gemacht werden, weil es im Gehirn einen großen Anteil von mehrfach ungesättigten ω -6 Fettsäuren enthält [496, 504, 505].

Nicht nur Lipidperoxidationen können sich auf mitochondriale Membranen und die Aktivität von Atmungskettenkomplexen auswirken, sondern auch die Lipidzusammensetzung. Daher ist eine Analyse der Lipide innerhalb der Mitochondrienmembran z.B. anhand der MALDI-TOF MS Methode nach Angelini et al. [443, 444] sinnvoll. Diese Methode wurde von meinem Kollegen Michael Muschol in der AG Dencher etabliert [413], bevor das Gerät defekt wurde.

ROS-induzierte DNA-Schäden sind ebenfalls von Relevanz. Da sie derzeit von meiner Kollegin Tamara Dzinic im Zusammenhang mit A β ₁₋₄₂ Peptiden untersucht werden, wird an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob die stark erhöhten ROS Mengen in A β ₁₋₄₂-behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten Proben auf vermehrte ROS Generierung oder auf geringere Mengen bzw. Aktivität von Antioxidanzien zurückzuführen waren. Zum Beispiel nach den Protokollen von Wydert und Cullen [506] können die Aktivitäten von Superoxiddismutasen (SODs), Katalase und Glutathionperoxidasen ermittelt werden. Die Aktivität von SODs lässt sich am besten innerhalb eines nativen Gels bestimmen,

weil so zwischen der mitochondrialen (SOD2, 88 kDa) und der cytosolischen Form (SOD1, 32 kDa) unterschieden werden kann. Katalaseaktivität wird über eine spektrophotometrische Methode anhand des Peroxidentfernungsvermögens gemessen oder ebenfalls innerhalb eines nativen Gels (Präzipitatbildung bei 220 kDa). In-Gel Glutathionperoxidase Aktivitätstests resultieren in Präzipitatbildung bei ungefähr 85 bis 90 kDa [506].

Alle Studien im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden an Zellen durchgeführt, die in Standard-2D-Zellkultur kultiviert wurden. Zellen in 2D-Kultur wachsen als flacher Monolayer auf der Plastikoberfläche des Kulturgefäßes (siehe Abb. 73A). *In vivo* sind allerdings fast alle Zellen von anderen Zellen und extrazellulärer Matrix 3-dimensional umgeben. 2D-Zellkulturen berücksichtigen somit nicht das natürliche 3D Umfeld der Zellen. Erkenntnisse, die durch 2D-Zellkultur gewonnen werden, können daher zu einer Fehleinschätzung der *in vivo* Antwort führen [507-509]. Zellen in 3D-Zellkultur imitieren das natürliche Gewebe sehr viel besser als Zellen aus 2D-Kulturen, weil sich sogenannte Spheroide ausbilden. Es wurde bereits gezeigt, dass die Zellantwort von 3D-Kulturen im Vergleich zu 2D-Kulturen eher dem *in vivo* Verhalten entspricht [510-512]. 3D-Kulturen eignen sich somit als gute *in vitro* Modellsysteme, die der *in vivo* Umgebung der Zellen entsprechen [507, 513-515]. Daher könnte es interessant sein, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien ebenfalls an 3D-Kulturen durchzuführen. In der Arbeitsgruppe Meckel (Fachbereich Biologie der TU Darmstadt) wurden kürzlich SH-SY5Y Zellen, die aus der AG Dencher stammten, von Laura Babel und Betina Fischer in 3D-Kultur kultiviert (siehe [516] und Abb. 73B-D). Sie nutzten kommerziell erwerbliches Matrigel (Sigma Aldrich, E1270) als künstliche extrazelluläre Matrix, innerhalb dieser sich nach mehreren Tagen Inkubationszeit Spheroide ausbildeten. Diese Spheroide entsprechen in ihrer Morphologie eher der natürlichen Form eines Gewebes innerhalb des Körpers. Darüber hinaus beinhalten Spheroide Zellen in verschiedenen Stadien: proliferierend, nicht proliferierend (G_0 -Phase), apoptotisch, hypoxisch und nekrotisch [517, 518]. Die äußere Schicht des Spheroids, umgeben vom sauerstoff- und nährstoffreichen Medium, besteht aus vitalen, proliferierenden Zellen [518]. Aufgrund des zum Zentrum des Spheroids hin fallenden Nährstoff- und Sauerstoffangebots nimmt die Zahl nicht proliferierender, nekrotischer und/oder hypoxischer Zellen zu [519]. Diese zelluläre Heterogenität wird auch in *in vivo* Geweben gefunden.

Die 3D-Zellkultur von SH-SY5Y Zellen wurde allerdings von Laura Babel und Betina Fischer in einem Volumen von 15 μ l auf Objektträgern verwirklicht [516]. Um die Studien der vorliegenden Arbeit an 3D-Zellkulturen durchführen zu können, müsste der Ansatz vergrößert werden. Alle durchflusszytometrischen und Mikrotiterplatten-Assays sollten sich dann jedoch verwirklichen lassen. Aus Kostengründen würde man von 3D-Zellkulturen wahrscheinlich keine Mitochondrien isolieren können, weil dafür ca. 5×10^8 Zellen benötigt werden und somit große Mengen an Matrigel. Gelbasierte Analysen müssten somit entfallen. Da extern applizierte $A\beta_{1-42}$ Peptide wahrscheinlich nicht zum Zentrum des Spheroids vordringen können, müssten die Zellen mit dem amyloiden Vorläuferprotein APP stabil transfiziert werden. Um die zelluläre $A\beta_{1-42}$ Konzentration zu erhöhen, würde sich eine Transfektion mit APP_{swe} empfehlen.

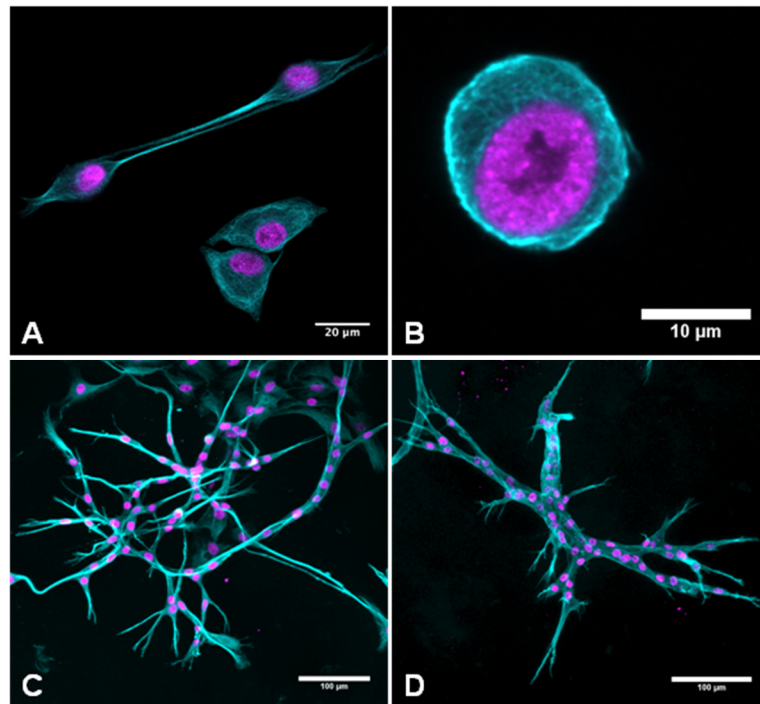


Abb. 73: Vergleich der Morphologie von SH-SY5Y Zellen in (A) 2D- und (B-D) 3D-Zellkultur. Das Cytoskelett der Zellen wurde mit der Antikörperkombination ms-anti- β -Tubulin (Primärantikörper) und gt-anti-ms-Alexa Fluor 568 (Sekundärantikörper) sichtbar gemacht (dargestellt in cyanblau). Der Nukleus wurde durch die Antikörperkombination rb-anti-Histon H2A und gt-anti-rb-Alexa Fluor 488 angefärbt (magenta). (A) Zellen in 2D-Kultur zeigen eine typische flache Morphologie mit teils langgestreckten Zellen. In 3D-Zellkultur werden (B) einen Tag nach dem Aussäen einzelne Zellen beobachtet, die (C) nach 3-4 Tagen Netzwerke ausbilden. (D) Diese Netzwerke werden nach 7 Tagen dicker und Zellen fusionieren. (Größenmaßstab: 20 μ m (A), 10 μ m (B), 100 μ m (C-D), mit freundlicher Genehmigung von Laura Babel, AG Meckel, TU Darmstadt)

Da die 3D-Zellkultur sehr kostenintensiv ist und sehr wahrscheinlich keine gelbasierten Methoden zur Anwendung kommen können, könnte auch die Reduktion des Sauerstoffs bei der Kultivierung von 2D-Zellkulturen physiologischere Bedingungen ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen wie allgemein üblich bei atmosphärischer Sauerstoffkonzentration (21%) kultiviert. Im Gewebe werden allerdings Sauerstoffkonzentrationen von 1-11% gefunden [520]. Hohe Sauerstoffkonzentrationen führen zu vermehrten ROS Mengen [521], die sich bereits auf unbehandelte Zellen negativ auswirken können. Der Sauerstoffeffekt auf 2D-Kulturen im Zusammenhang mit den Auswirkungen von A β ₁₋₄₂ Peptiden wird derzeit von meiner Kollegin Tamara Dzinic untersucht. Sie kultiviert SH-SY5Y Zellen sowohl bei 21% als auch bei 5% Sauerstoff. Da für die Kultivierung bei 5% Sauerstoff ein spezielles Gasgemisch benötigt wird, handelt es sich auch hierbei um eine kostenintensive Methode.

Um physiologische *in vivo* Bedingungen *in vitro* nachahmen zu können, müssen höhere Kosten in Kauf genommen werden, entweder für die Realisierung von 3D-Kulturen oder die Kultivierung von 2D-Kulturen bei reduzierten Sauerstoffkonzentrationen. Die dadurch erhaltenen Ergebnisse sollten dafür das *in vivo* Verhalten der Zellen auf A β ₁₋₄₂ Peptide physiologische relevanter widerspiegeln.

Trotz der Verbesserungsmöglichkeiten in den verwendeten Modellsystemen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit signifikante, A β ₁₋₄₂-induzierte Veränderungen der Zellphysiologie und der mitochondrialen Funktion gefunden. Diese Erkenntnisse können zur Entwicklung von Präventionsmöglichkeiten sowie Therapien beitragen, weil sie Informationen über die Anfangsphase der AD Pathogenese liefern.

7 Anhang

7.1 Aminosäuresequenz des humanen amyloiden Vorläuferproteins APP (modifiziert nach UniProtKB - P05067 [81])

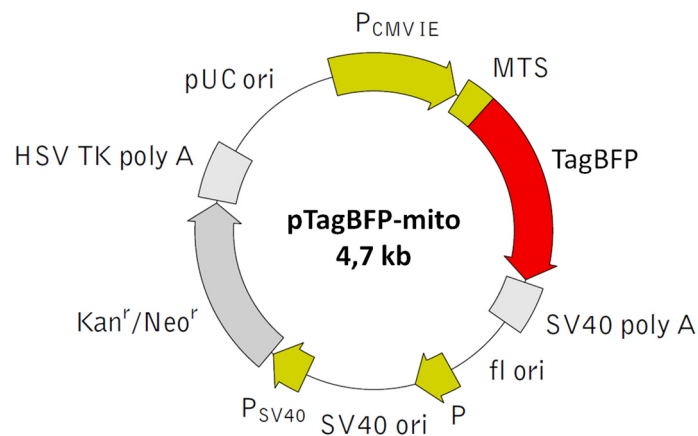
10	20	30	40	50
MLPGLALLLL	AAWTARALEV	PTDGNAGLLA	EPQIAMFCGR	LNMHMNVONG
60	70	80	90	100
KWSDPSGTK	TCIDTKEGIL	OYCOEVPEL	OITNVVEANO	PVTIONWCKR
110	120	130	140	150
GRKQCKTHPH	FVIPYRCLVG	EFVSDALLVP	DKCKFLHQER	MDVCETHLHW
160	170	180	190	200
HTVAKETCSE	KSTNLHDYGM	LLPCGIDKFR	GVEFVCCPLA	EESDNVDSAD
210	220	230	240	250
AEEDSDVWW	GGADTDYADG	SEDKVVEVAE	EEEVAEVEEE	EADDDDEDDED
260	270	280	290	300
GDEVEEEAEE	PYEEATERTT	SIATTTTTTT	ESVEEVVREV	CSEQAETGPC
310	320	330	340	350
RAMISRWFYD	VTEGKCAPFF	YGGCGGNRRN	FDTEEYCMAY	CGSAMSQSLL
360	370	380	390	400
KTTOEPLARD	PVKLPTTAAS	TPDAVDKYLE	TPGDENEHAH	FOKAKERLEA
410	420	430	440	450
KHRERMSQVM	REWEEAERQA	KNLPKADKKA	VIQHFQEKVE	SLEQEAANER
460	470	480	490	500
OOLVETHMAR	VEAMLNDRRR	LALENYITAL	OAVPPRPRHV	FNMLKKYVRA
510	520	530	540	550
EOKDROHTLK	HFEHVRMVDP	KKAAQIRSOV	MTHLRVIYER	MNQSLSLLYN
560	570	580	590	600
VPAVAEEIQD	EVDELLOKEQ	NYSDDVLAM	ISEPRISYGN	DALMPSLTET
610	620	630	640	650
KTTVELLPVN	GEFSLDDLQP	WHSFGADSV	ANTENEVEPV	DARPAADRGL
660	670	680	690	700
TTRPGSGLTN	IKTEEISEVK	MDAEFRHDSG	YEVHHQKLVF	FAEDVGSNKG
710	720	730	740	750
AIIGLMVGGV	VIATVIVITL	VMLKKKQYTS	IHHGVVEVDA	AVTPEERHLS
760	770			
KMQONGYENP	TYKFFEOMQN			

Signalpeptid N-APPβ sAPPβ sAPPα Aβ₁₋₄₂
 P3(42) C83 γCTF57 TMD

Name	Abkürzung	Position	Länge
Extrazelluläre Domäne		AS 18-699	682 AS
Transmembrandomäne	TMD	AS 700-723	24 AS
APP intrazelluläre Domäne	AICD	AS 724-770	47 AS
Signalpeptid		AS 1-17	17 AS
Amyloid beta A4 Protein (human, Isoform APP770)	APP	AS 18-770	753 AS
N-terminales APP Fragment	N-APP β	AS 18-286	269 AS
Lösliches APP β	sAPP β	AS 18-671	654 AS
Lösliches APP α	sAPP α	AS 18-687	670 AS
Amyloides- β Peptid 1-42	A β ₁₋₄₂	AS 672-713	42 AS
P3(42)	P3(42)	AS 688-713	24 AS
C83 Fragment	C83	AS 688-770	83 AS
C99 Fragment	C99	AS 672-770	99 AS
γ -Sekretase C-terminales Fragment 57	γ CTF57	AS 714-770	57 AS
Kunitz Domäne		AS 291-341	51 AS

Anmerkung: Im humanen Gehirn kommen drei Isoformen des amyloiden Vorläuferproteins vor: APP770, APP751 und APP695 [522]. Letztere ist vorherrschend im gesunden humanen Gehirn. APP695 weist im Vergleich zu der hier dargestellten Isoform APP770 eine Punktmutation an Position 289 auf (E→V) und die Positionen 290-364 fehlen. Bei der Isoform APP751 existiert eine Punktmutation an Position 345 (M→I) im Vergleich zum APP770 und die Positionen 346-364 sind nicht vorhanden [81]. Bei AD wird die Expression von APP770 und APP751 hochreguliert [523]. Beide Isoformen enthalten die sogenannte Kunitz Domäne (AS 291-341), die als Proteaseinhibitor fungiert [81, 522].

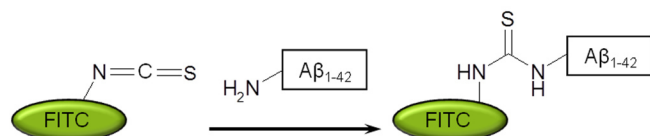
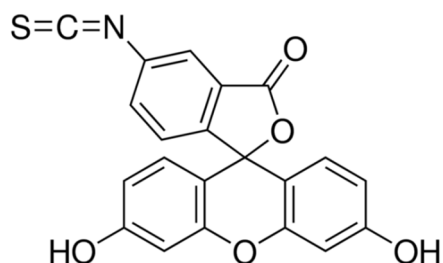
7.2 Vektorkarte von pTagBFP-mito (modifiziert nach [524])



pTagBFP-mito

Vector type	Mammalian expression vector
Reporter	TagBFP
Reporter codon usage	Mammalian
Promotor for TagBFP	P _{CMV IE}
Host cells	Mammalian
Selection	Prokaryotic - kanamycin Eukaryotic - neomycin (G418)
Replication	Prokaryotic - pUC ori Eukaryotic - SV 40 ori
Use	Fluorescent labeling of mitochondria

7.3 Struktur von Fluoresceinisothiocyanat und die Kopplung an A β ₁₋₄₂



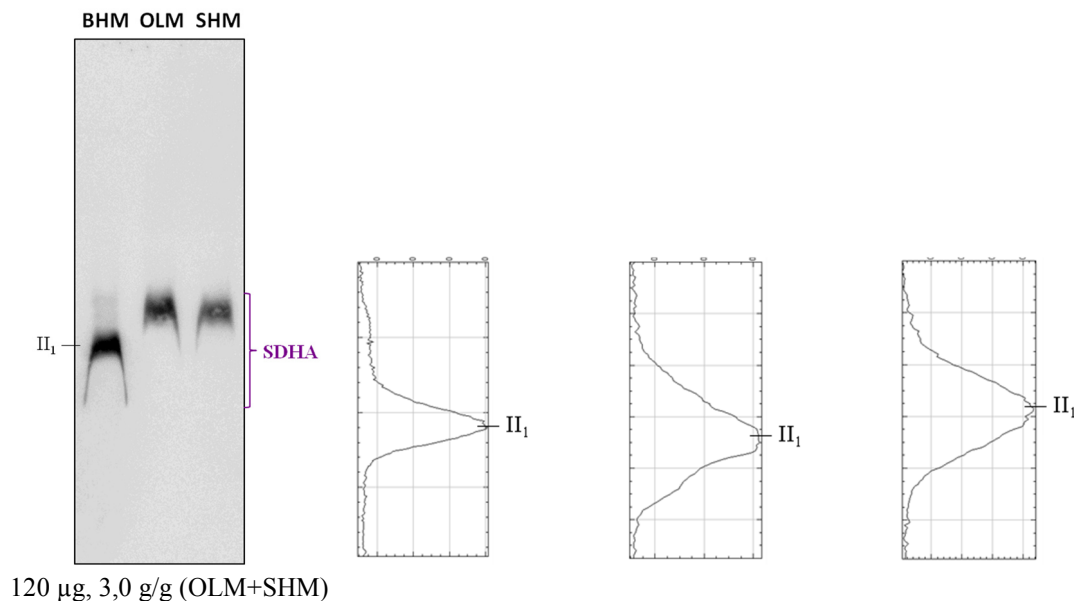
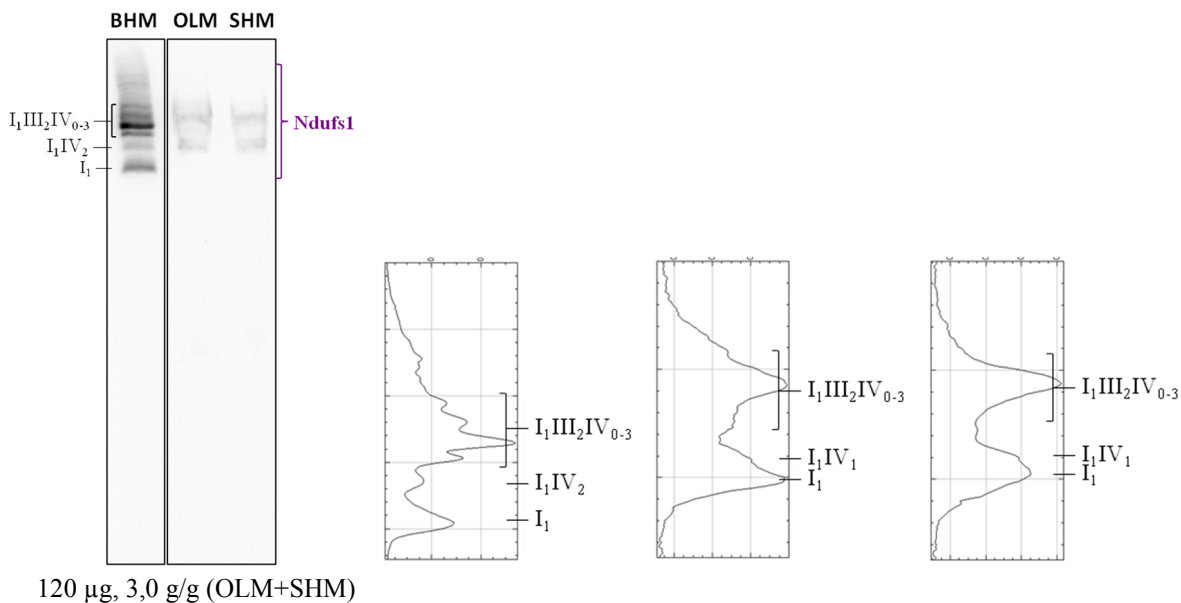
Die Isothiocyanatgruppe reagiert mit der N-terminalen Aminogruppe des Peptids. Es entsteht eine stabile Thio-carbamidbindung zwischen Fluorophor und dem A β ₁₋₄₂.

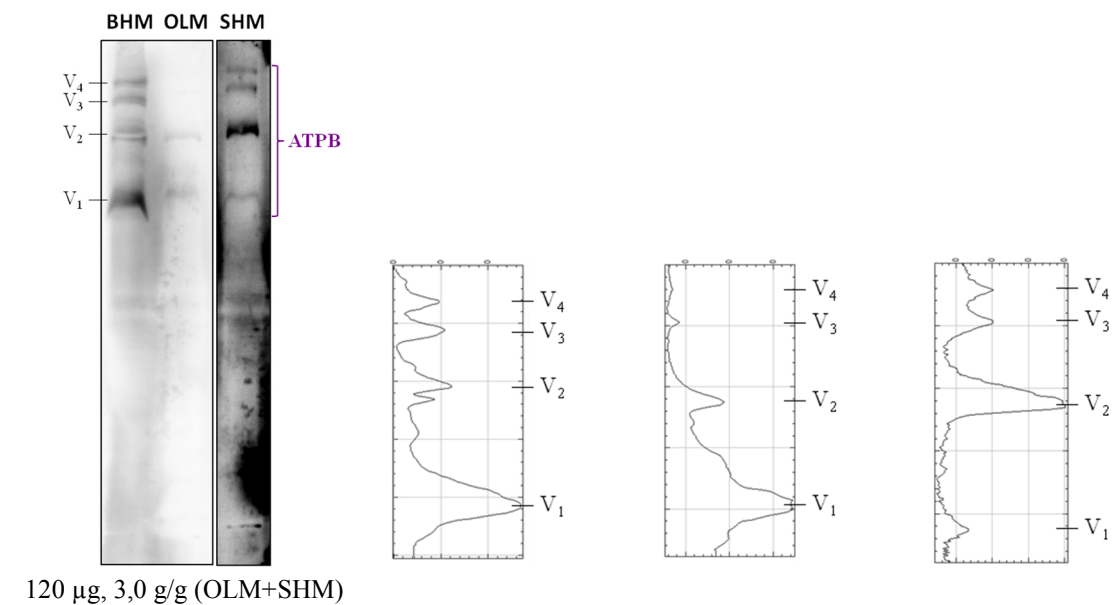
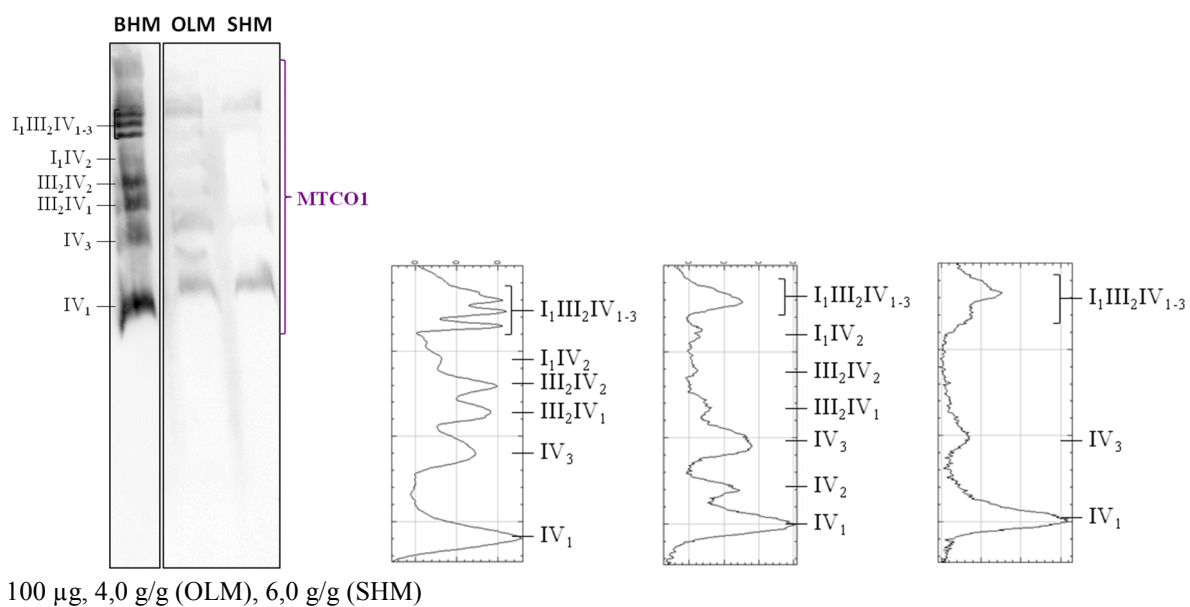
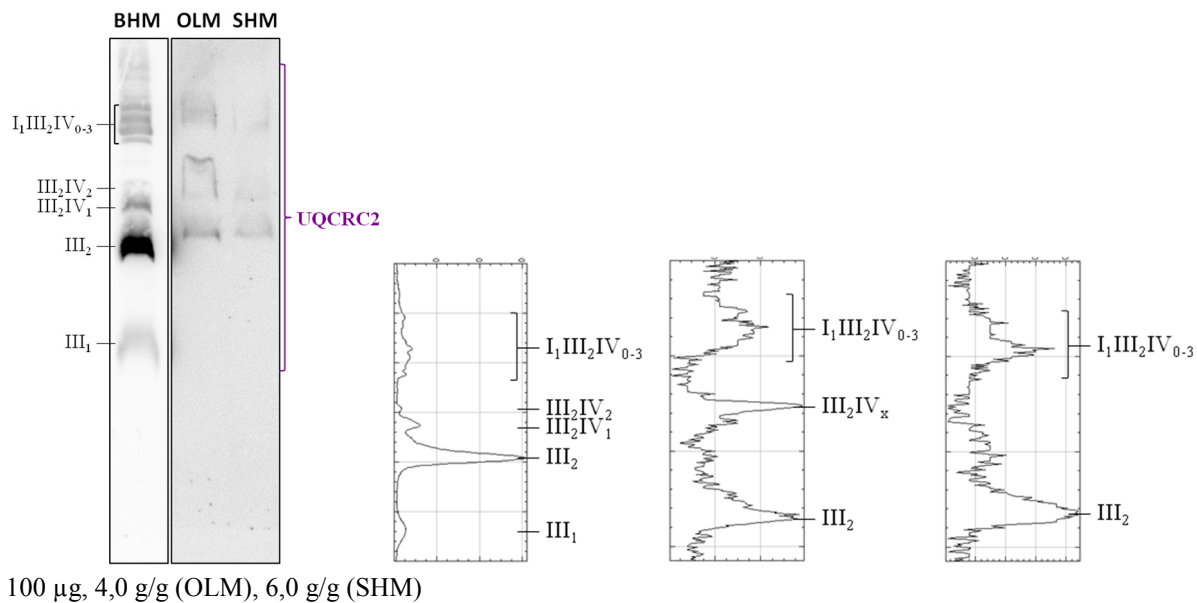
Fluoresceinisothiocyanat (FITC) [525]

7.4 BN Western Blots

7.4.1 OLN-93 und SH-SY5Y

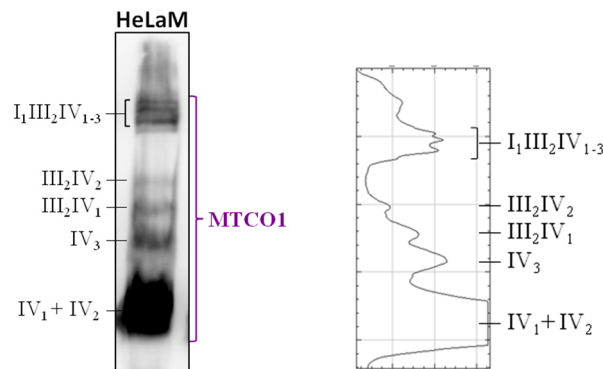
Solubilisierte Mitochondrienproteine wurden in einer BN-PAGE aufgetrennt und anschließend ein Western Blot durchgeführt (siehe 4.23). Abb. 39 zeigt Ausschnitte der hier dargestellten BN Western Blots. BHM diente als Standard, weil es keinen Größenstandard für BN-Gele gibt, der im BN Western Blot sichtbar gemacht werden kann und weil BHM in der AG Dencher gut charakterisiert ist. Neben den BN-Blots ist für jede Probe ein Plotprofil abgebildet, anhand dessen sich die Banden speziell für OLM und SHM besser zuordnen lassen. Tab. 20 können die Abkürzungen der Antikörper entnommen werden.





7.4.2 HeLa

Die Mitochondrienisolation wurde von Bettina Rieger in Osnabrück nach dem in der AG Dencher etablierten Protokoll durchgeführt (siehe 4.16.1). Alle weiteren Schritte wurden von mir vorgenommen (siehe 4.20.2, 4.21.2 und 4.23). Es gab keine Vorversuche zur Bestimmung des optimalen D/P. 100 µg Mitochondrienproteine aus HeLa Zellen (HeLaM) wurden mit einem D/P von 4,0 g/g und einem Digitoninanteil von 1,0% solubilisiert. BN-PAGE und BN Western Blot zum Nachweis der Komplex IV Untereinheit MTCO1 wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt.

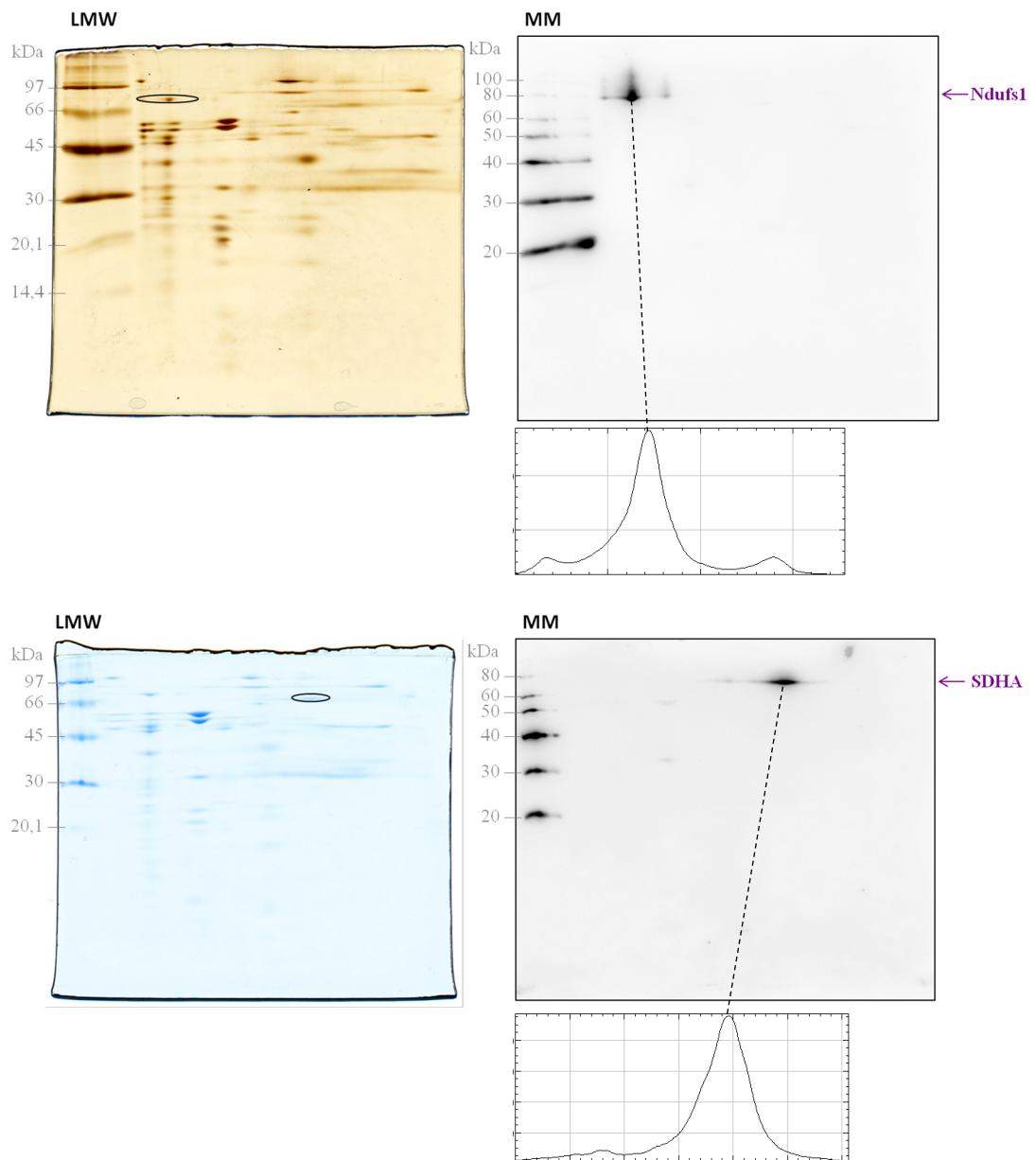


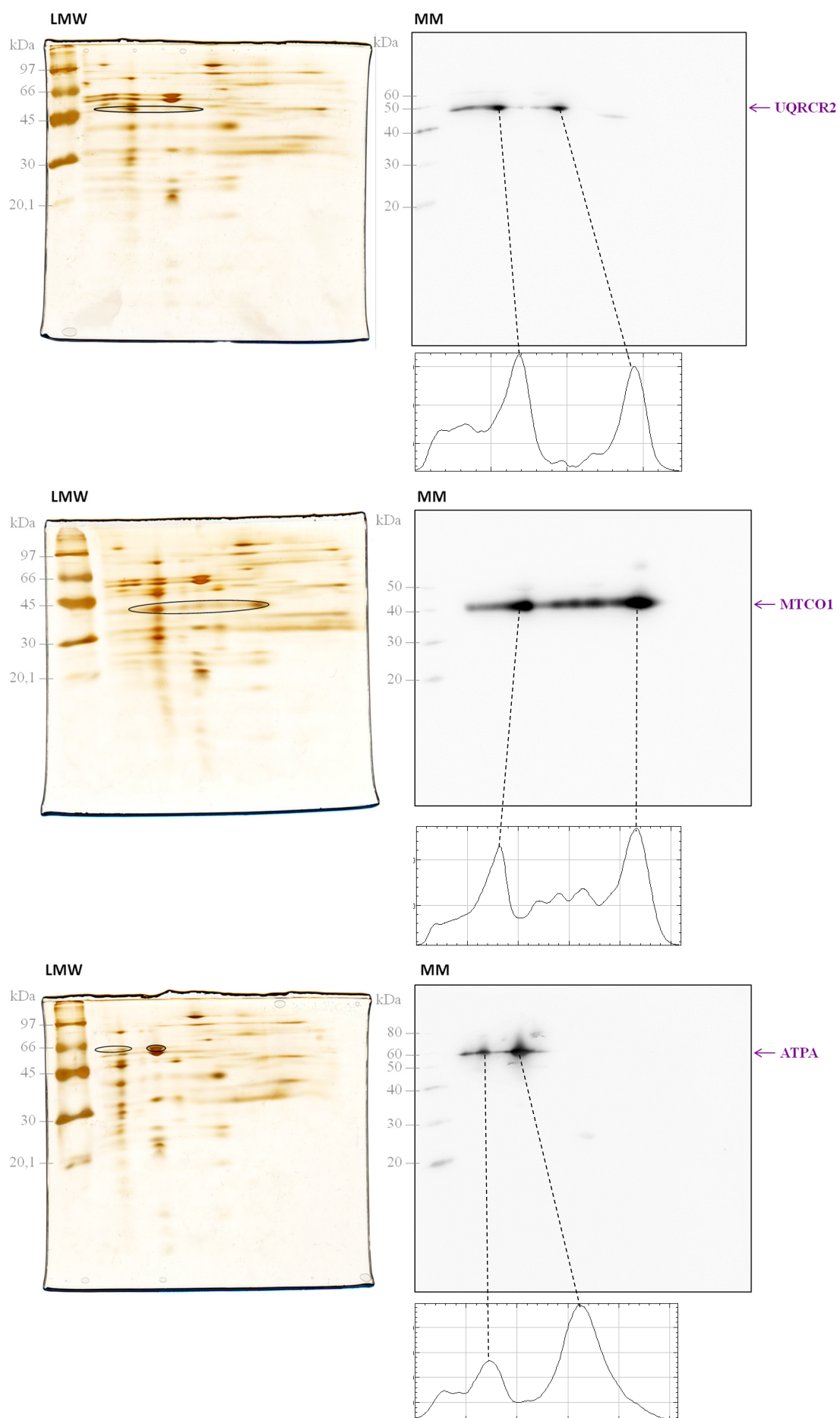
7.5 2D Western Blots

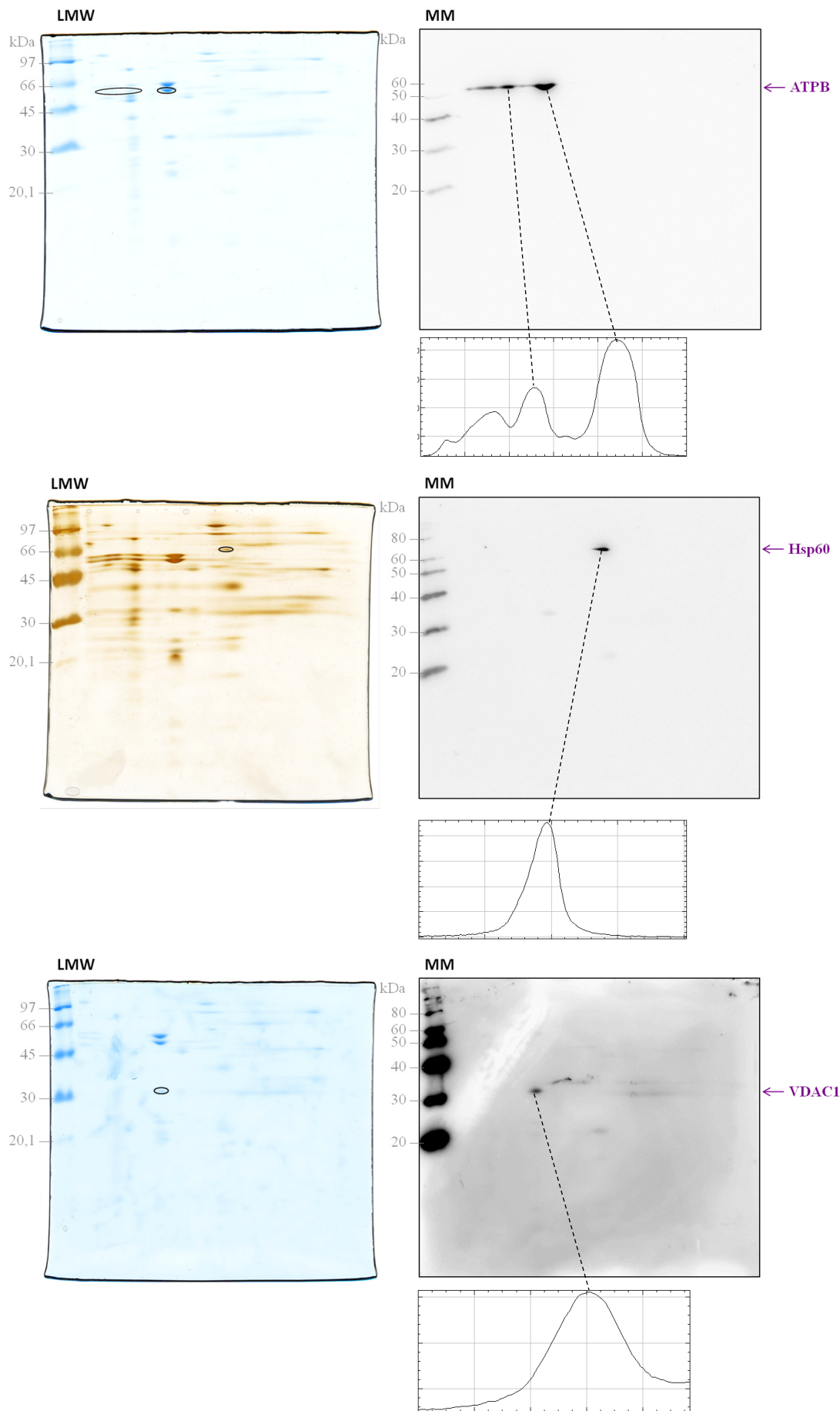
Bei den hier dargestellten 2D-Gelen (links, siehe 4.21.3) handelt es sich um Gele, die nach dem Blotvorgang (siehe 4.23) mit Silber, Coomassie oder SYPRO® Ruby gefärbt wurden (siehe 4.26), um die noch im Gel verbliebenen Proteine sichtbar zu machen. Auf der rechten Seite ist die Nitrozellulosemembran mit entsprechender Antikörperdetektion (Abkürzungen können Tab. 20 entnommen werden) abgebildet. Abb. 41 zeigt Ausschnitte der hier gezeigten Nitrozellulosemembranen. Unterhalb jeder Nitrozellulosemembran befindet sich das Plotprofil, anhand dessen Aussagen darüber getroffen werden können, wie viele einzelne Spots detektiert wurden. Zur besseren Orientierung wurden einige Extrema der Plotprofile durch gestrichelte Linien mit den entsprechenden Spots auf dem 2D Western Blot verbunden.

7.5.1 BHM

Für jedes 2D-Gel wurden 30 µg BHM (D/P: 3,0 g/g) in einer 2D-BN/SDS-PAGE aufgetrennt.

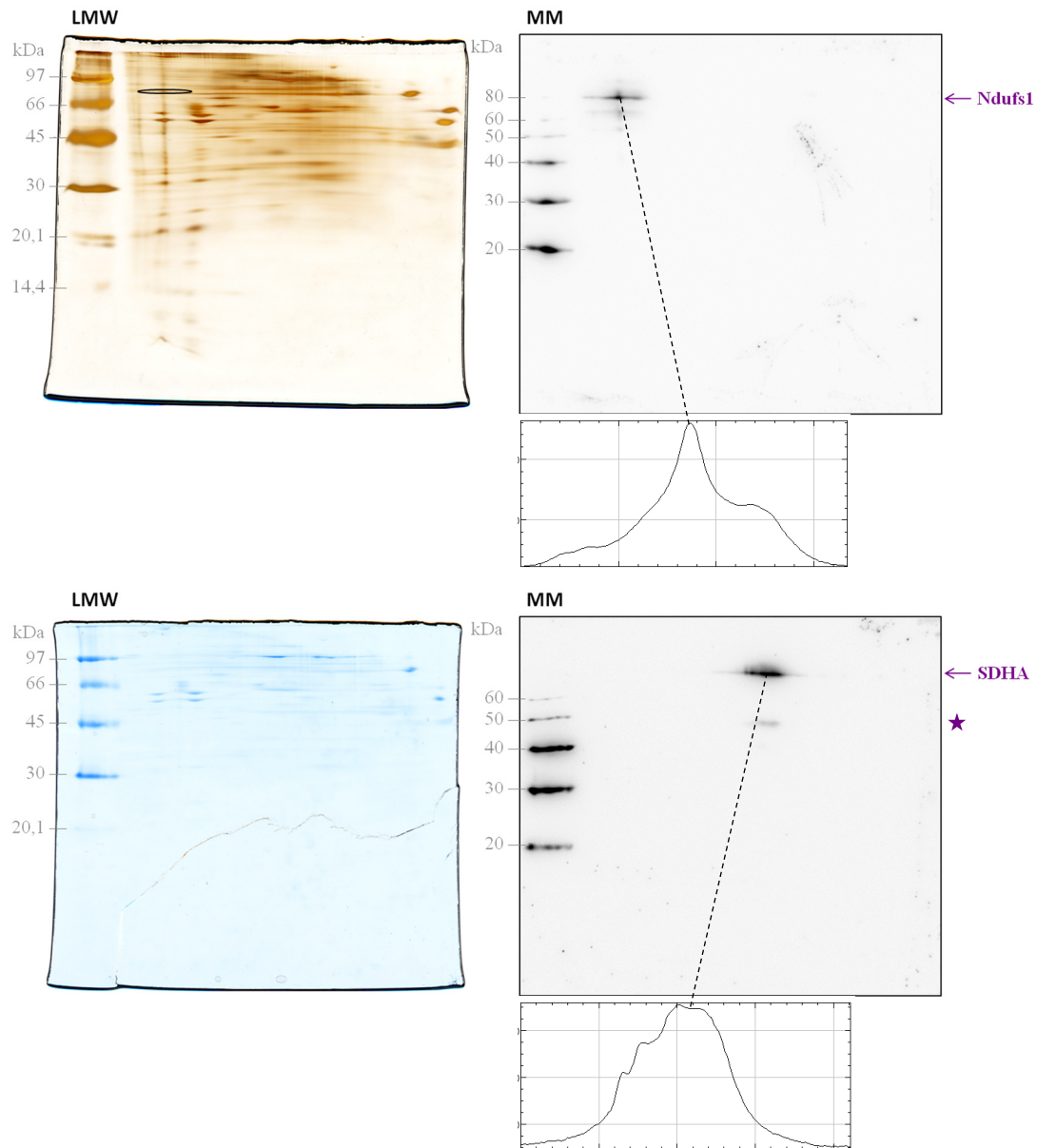


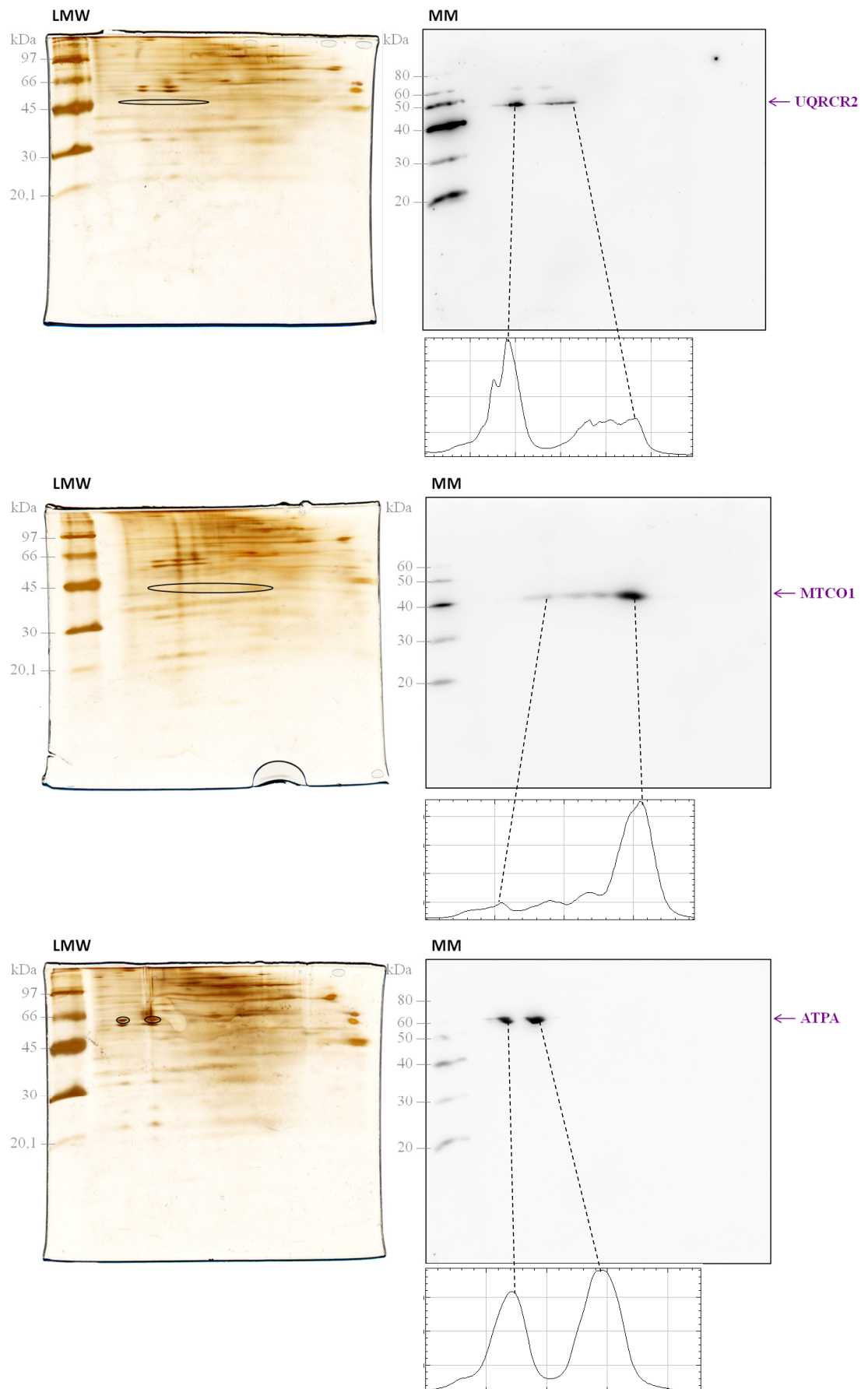


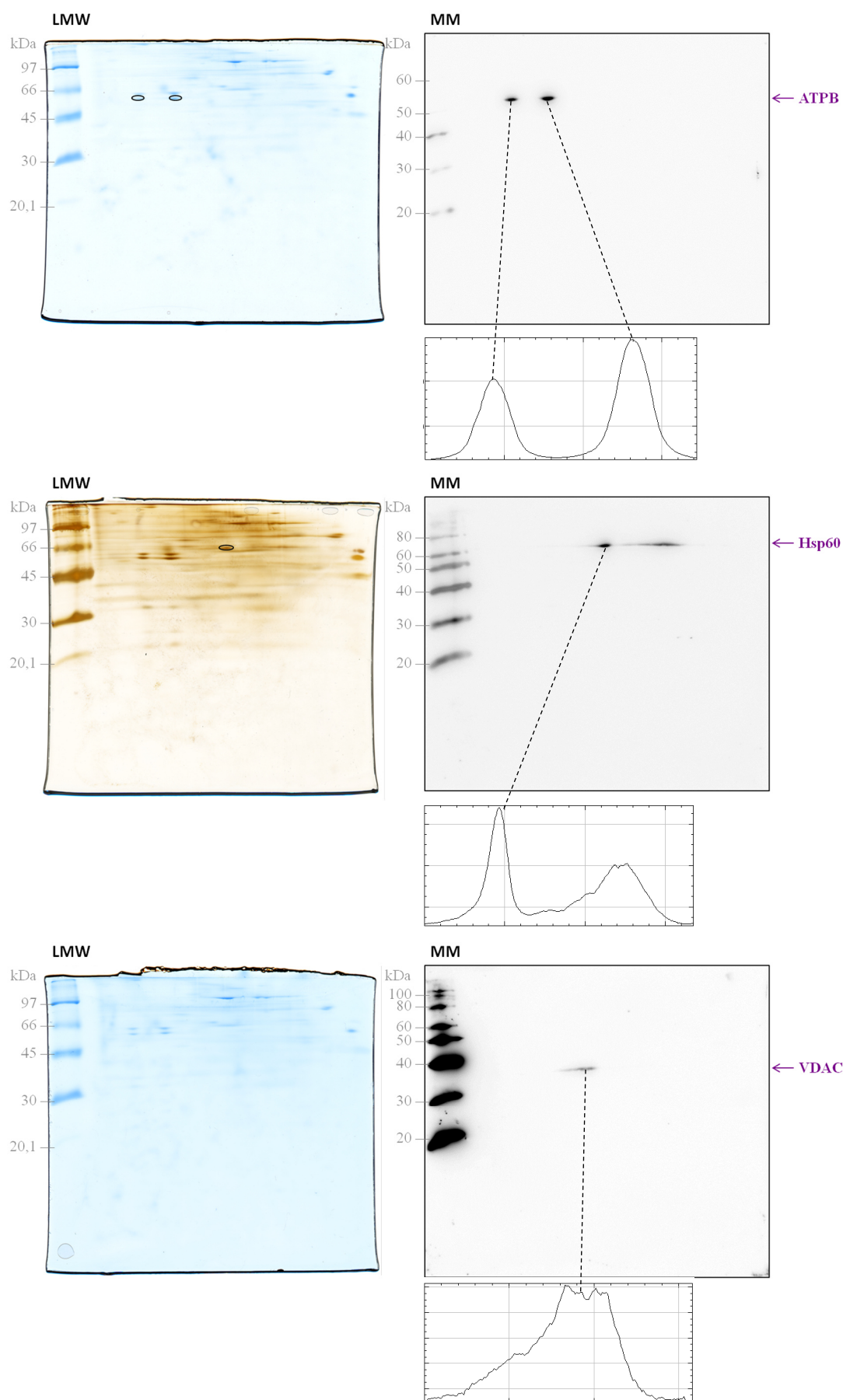


7.5.2 OLN-93

Die 2D-BN/SDS-PAGE wurde jeweils mit 100 µg Mitochondrienproteinen (D/P: 4,0 g/g) aus OLN-93 Zellen durchgeführt.

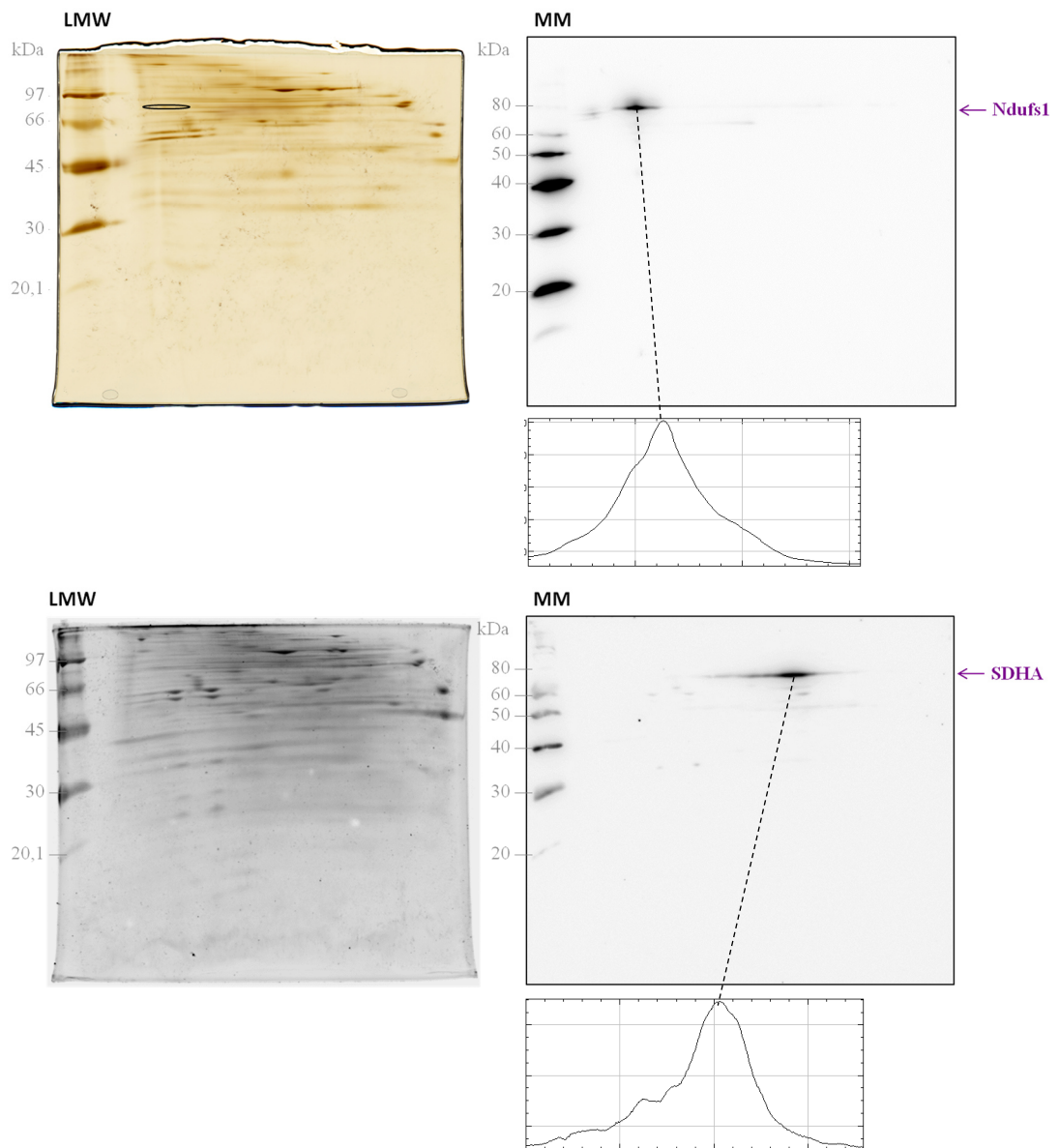


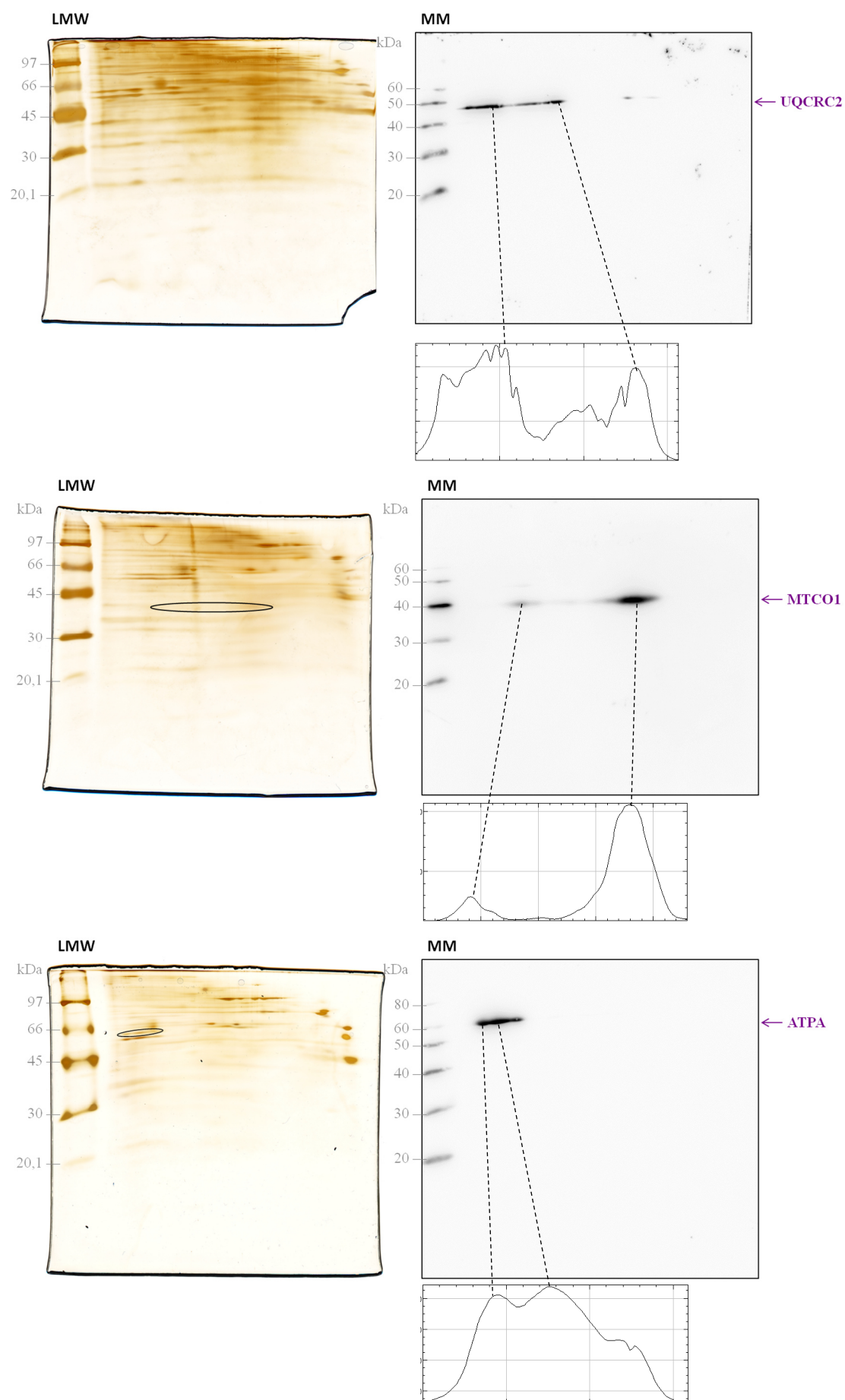


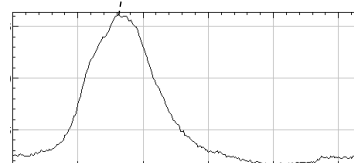
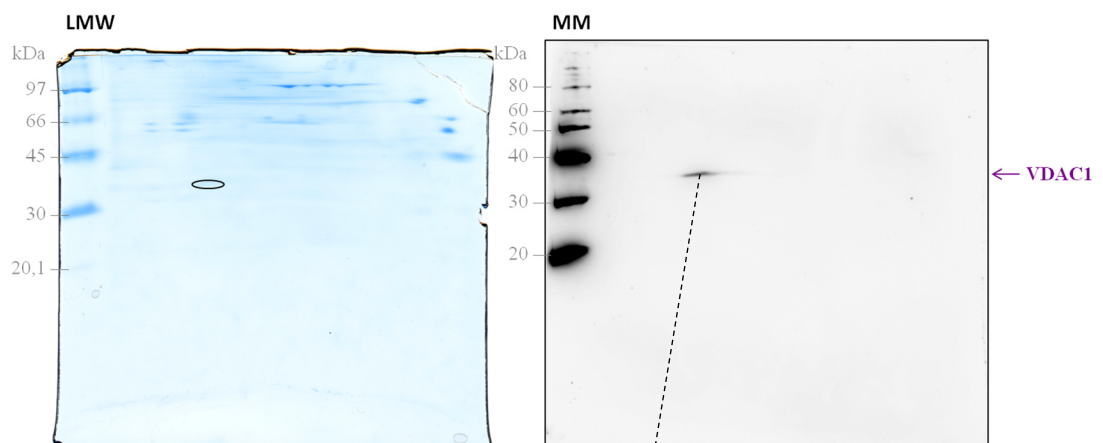
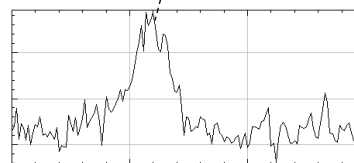
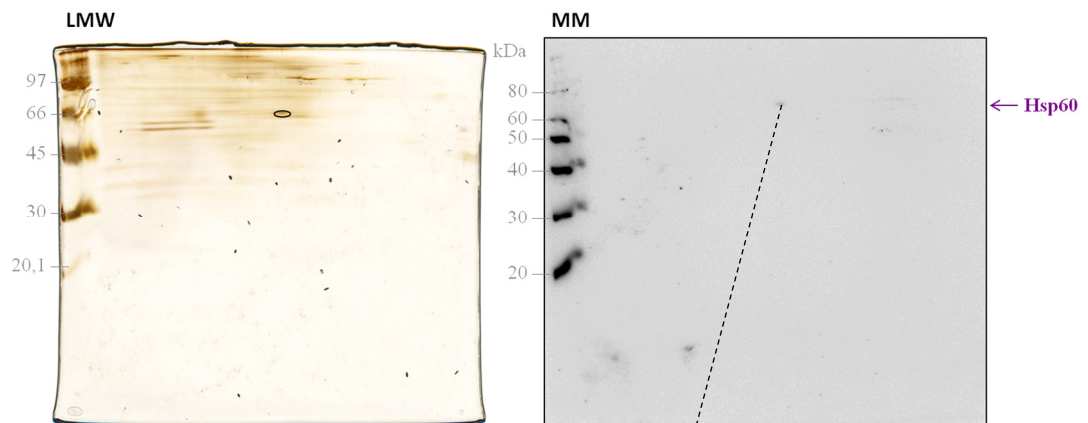
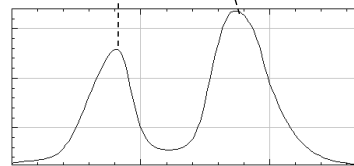
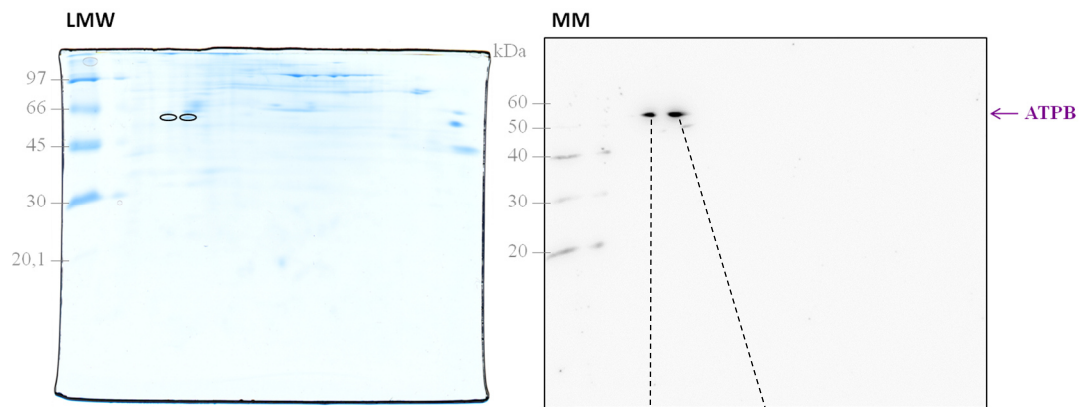


7.5.3 SH-SY5Y

Die 2D-BN/SDS-PAGE wurde für die Identifizierung von CI, CIV, CV α , Hsp60 und VDAC1 mit 100 μ g Mitochondrienproteinen (D/P: 6,0 g/g) aus SH-SY5Y Zellen durchgeführt und für CII, CIII und CV β mit 120 μ g (D/P: 3,0 g/g).



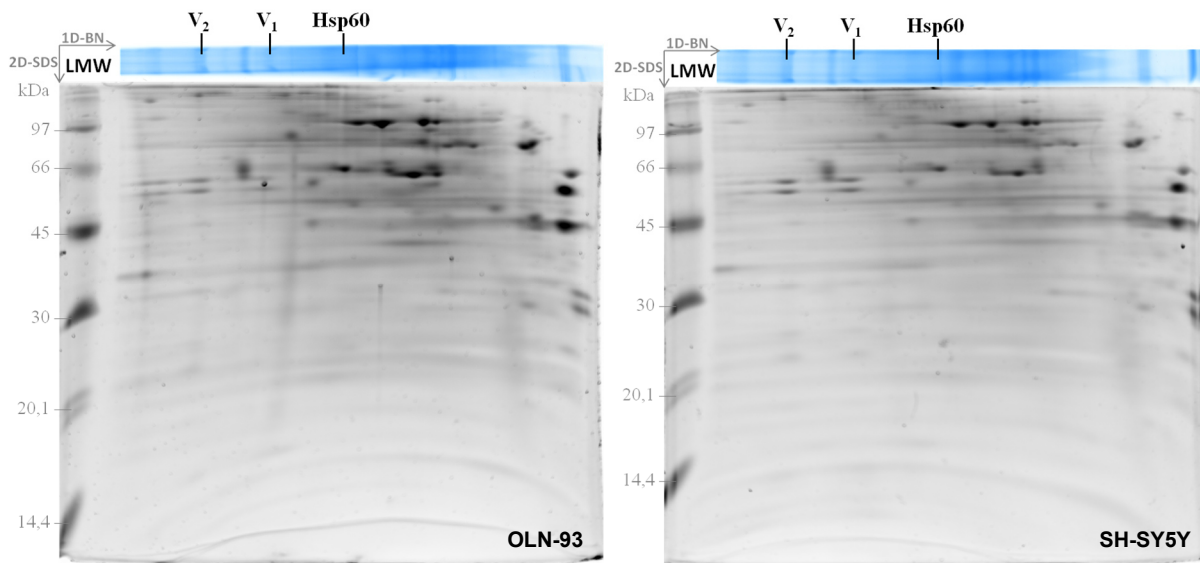




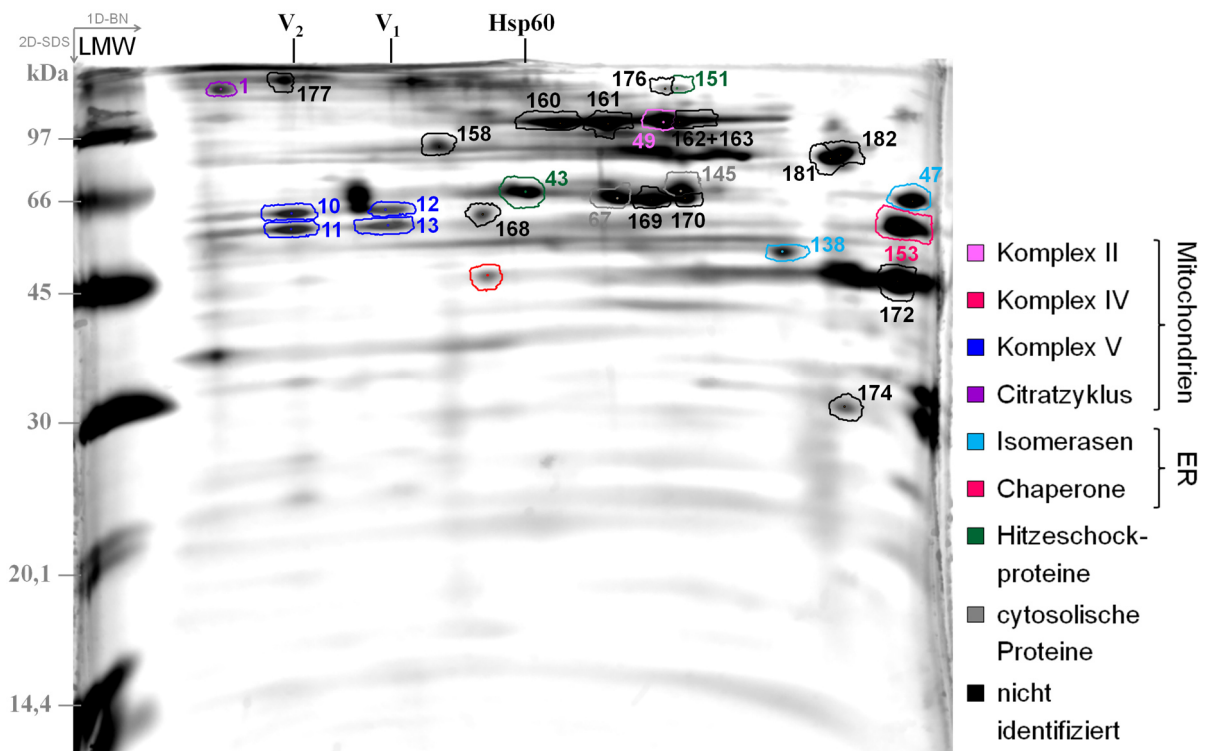
7.6 Quantitative Proteomanalyse: OLN-93 vs. SH-SY5Y

Solubilisierte Mitochondrienproteine wurden in einer 2D-BN/SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.21.3) und mittels SYPRO® Ruby gefärbt (siehe 4.26.3). Abbildung A zeigt repräsentative SYPRO® Ruby gefärbte 2D-Gele, anhand denen die quantitative Proteomanalyse mittels der Software Delta2D durchgeführt wurde. Auf dem Fusionsgel in Abbildung B sind die für die Quantifizierung herangezogenen Proteinspots markiert (Proteinennamen zu den Spotnummern können Tab. 26 und Tab. 27 sowie Kratochwil [311] entnommen werden). Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle C dargestellt.

A Repräsentative SYPRO® gefärbte 2D-Gele



B Fusionsgel von unbehandelten OLN-93 und SH-SY5Y Proben (jeweils n = 3)



C Ergebnisse der Quantifizierung: OLN-93 vs. SH-SY5Y

Der Unterschied ergibt sich aus dem Quotienten von Protein x (SH-SY5Y) und Protein x (OLN-93)

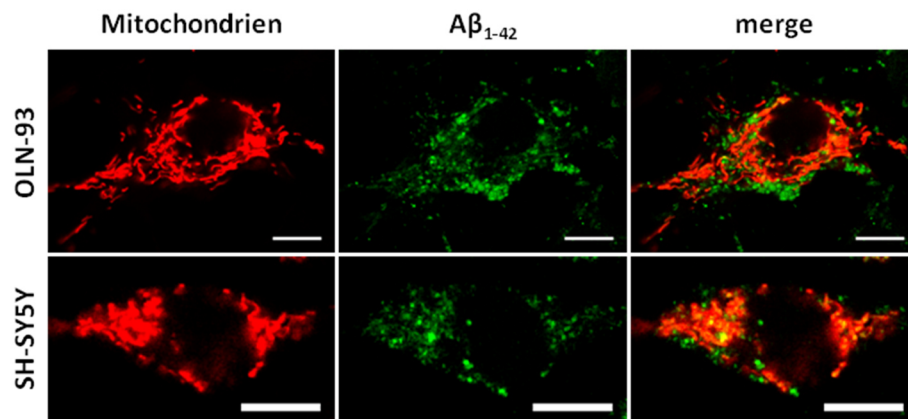
Nr.	Proteinname	Unterschied [%]	p-Wert
1	2-oxoglutarate dehydrogenase	-16,69	0,1765
10	ATP synthase subunit alpha	48,92	3,1E-05
11	ATP synthase subunit beta	48,17	0,0002
12	ATP synthase subunit alpha	128,62	0,0006
13	ATP synthase subunit beta	80,64	0,0053
43	60 kDa heat shock protein	-11,84	0,1958
47	Protein disulfide-isomerase	-2,26	0,8564
49	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	-28,14	0,0211
67	Pyruvate kinase PKM	-4,41	0,5692
138	Protein disulfide-isomerase A6	2,72	0,7037
145	WD repeat-containing protein 1	-12,03	0,0412
151	Endoplasmin	-23,55	0,0697
153	Calreticulin	10,28	0,2480
O	Cytochrome c oxidase subunit I	-13,28	0,2719
158	Nicht identifiziert	-20,43	0,0556
160	Nicht identifiziert	12,99	0,3924
161	Nicht identifiziert	-23,35	0,0423
162+163	Nicht identifiziert	-20,91	0,1300
168	Nicht identifiziert	-20,69	0,0251

Nr.	Proteinname	Unterschied [%]	p-Wert
169	Nicht identifiziert	-16,87	0,0705
170	Nicht identifiziert	-41,39	0,0001
172	Nicht identifiziert	1,84	0,7142
174	Nicht identifiziert	1,67	0,8307
176	Nicht identifiziert	2,53	0,9431
177	Nicht identifiziert	-24,02	0,0344
181	Nicht identifiziert	-15,01	0,2939
182	Nicht identifiziert	-8,20	0,5912

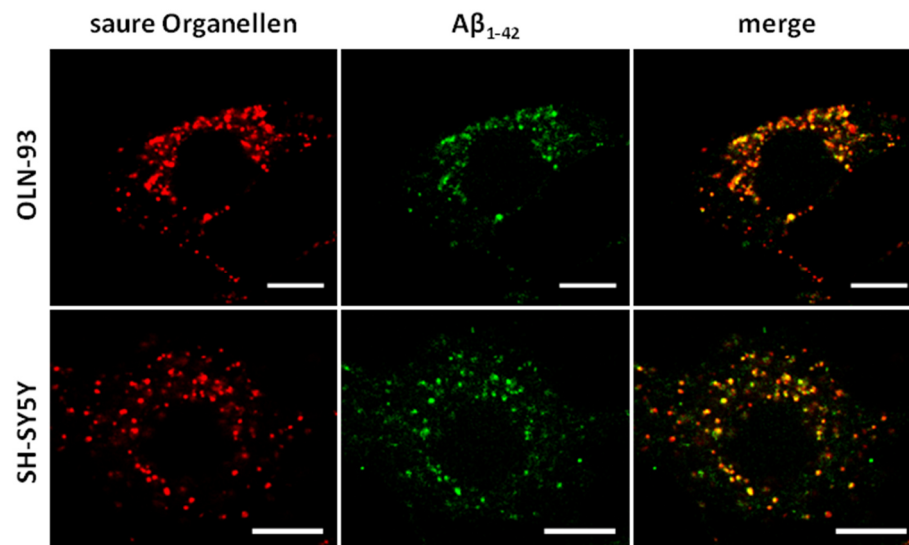
7.7 Intrazelluläre Lokalisation von A β ₁₋₄₂ Peptiden

Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.9 beschrieben für die Messung am Konfokalmikroskop (siehe 4.14) vorbereitet. Abgebildet ist ein zweiter Datensatz zu den intrazellulären Lokalisationsstudien, die Abb. 49 bis Abb. 51 entnommen werden können.

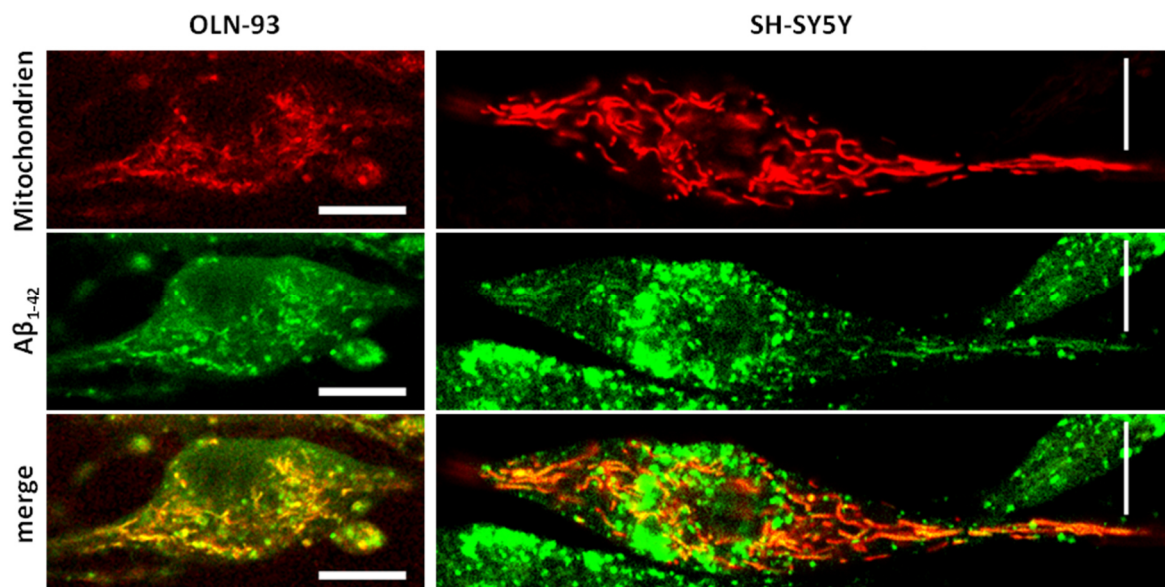
- A** Keine Kolo-kalisation von Mitochondrien und extern applizierten A β ₁₋₄₂ Peptiden nach 3 h Inkubation (Größenmaßstab: 10 μ m).



B Kolokalisation von sauren Organellen und extern applizierten A β ₁₋₄₂ Peptiden nach 5 h (Größenmaßstab: 10 μ m).

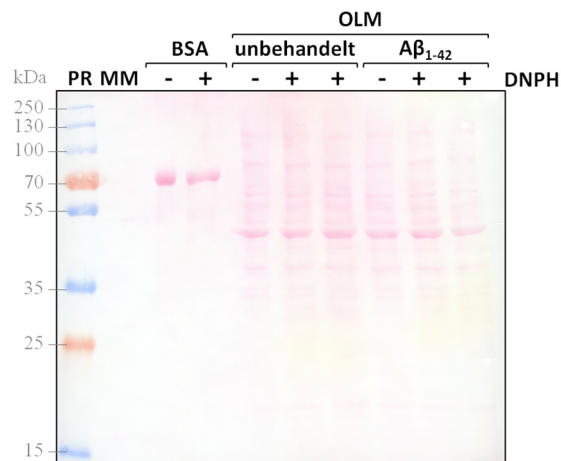


C Kolokalisation von Mitochondrien und extern applizierten A β ₁₋₄₂ Peptiden nach 16 h (Größenmaßstab: 10 μ m).



7.8 Identifikation von Proteinmodifikationen

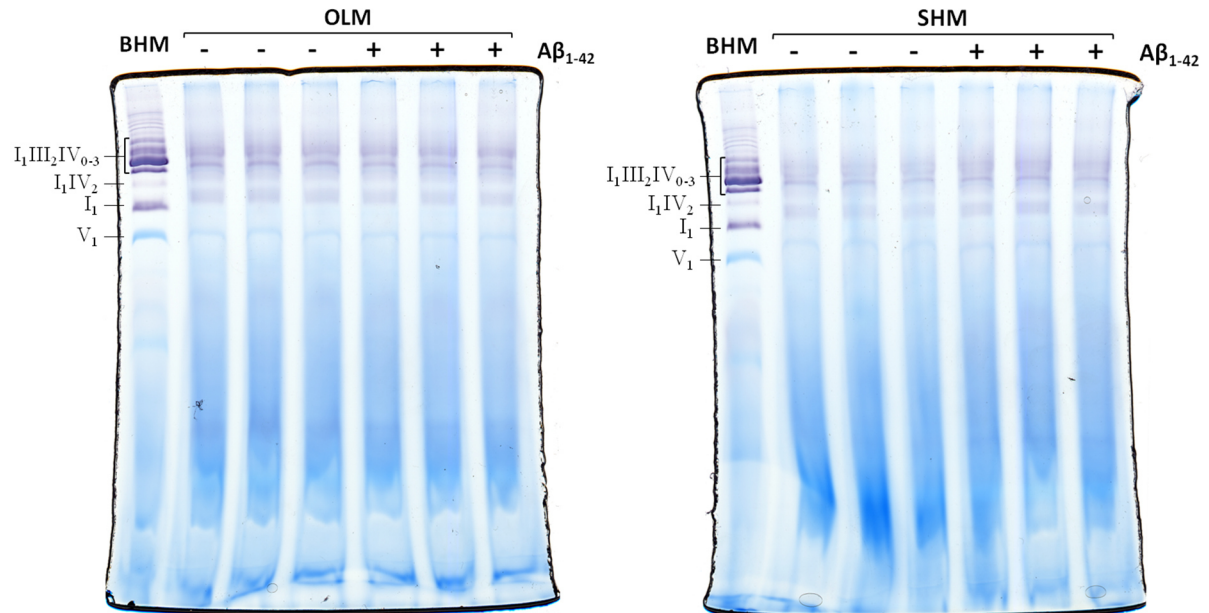
Nach dem Transfer der Mitochondrienproteine auf eine Nitrozellulosemembran für die anschließende Detektion von carbonylierten Proteinen (siehe 4.25), wurden die Proteine mit Ponceau S gefärbt (siehe 4.26.4). Anhand der Färbung wurde ein einheitlicher Transfer ohne Luftblasen sichergestellt, der Grundlage für die Quantifizierung eines Western Blots ist. Zudem wurde dadurch veranschaulicht, dass auf die Spuren, für die im Oxyblot™ kein Signal detektiert wurde, Proben aufgetragen wurden.



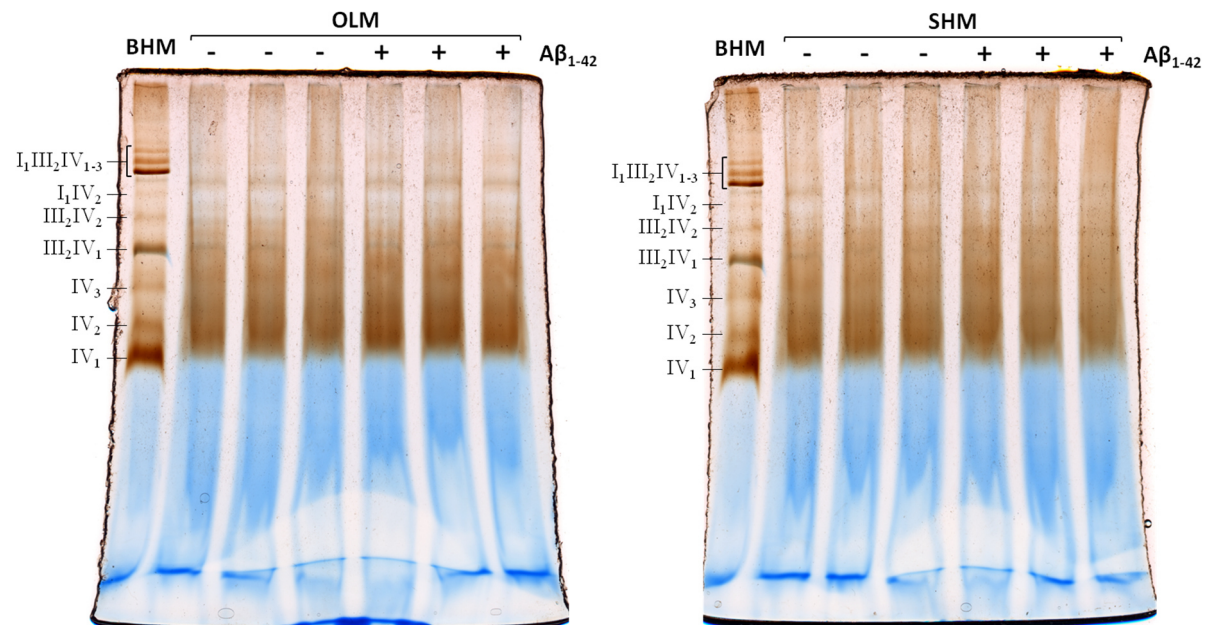
7.9 Aktivität von Atmungskettenkomplexen

Solubilisierte Mitochondrienproteine wurden mittels BN-PAGE aufgetrennt und einem in-Gel CI bzw. CIV Aktivitätstest unterzogen (siehe 4.22.1.1). Abb. 57A und Abb. 58A zeigen Ausschnitte der hier abgebildeten BN-Gele.

A In-Gel Komplex I Aktivitätstests

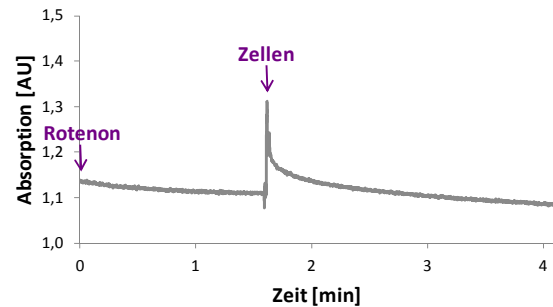
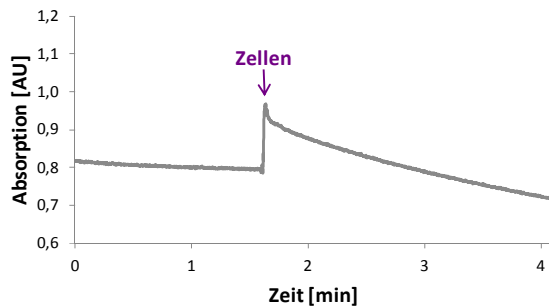


B In-Gel Komplex IV Aktivitätstests

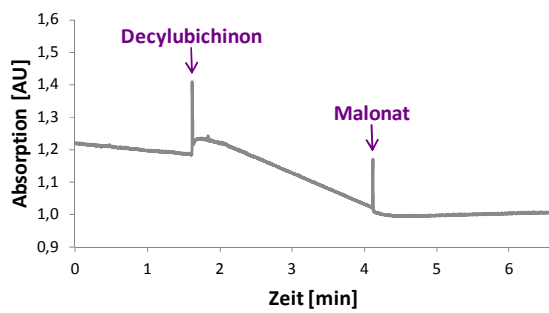


In-Lösung Aktivitätstests wurden wie in Kapitel 4.22.2 beschrieben durchgeführt. Abbildungen C, D, F und G zeigen repräsentative Graphen der Aktivitätsmessungen für unbehandelte OLN-93 Proben. In Abbildung E sind die Absorptionsspektren von oxidiertem und reduziertem Cytochrom c dargestellt.

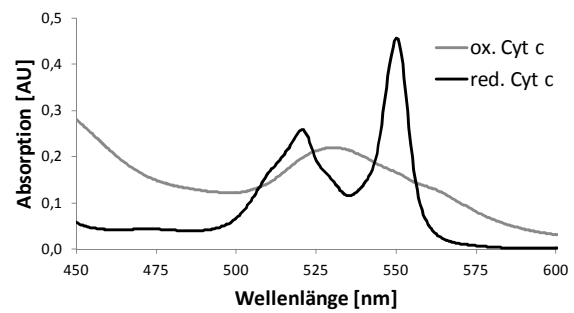
C In-Lösung Komplex I Aktivitätstest (rechts Inhibitormessung mit Rotenon)



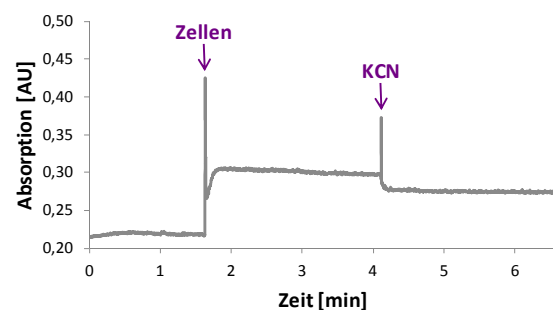
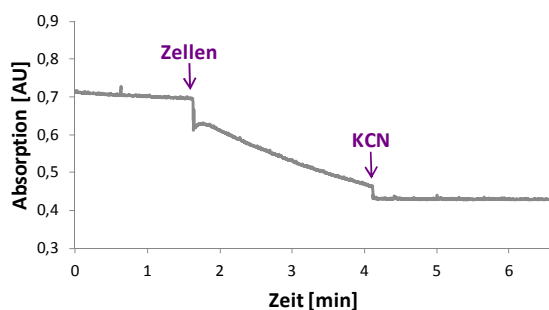
D In-Lösung Komplex II Aktivitätstest



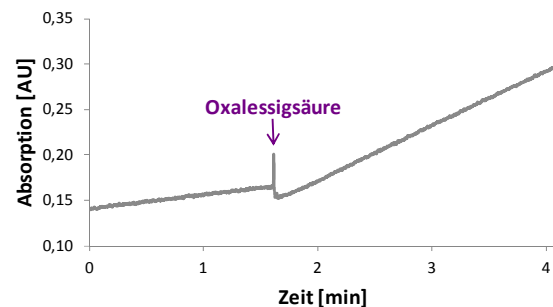
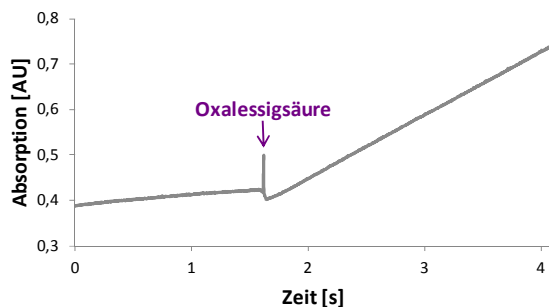
E Absorptionsspektren von ox. und red. Cyt c



F In-Lösung Komplex IV Aktivitätstest (links mit red. Cyt c, rechts mit ox. Cyt c)

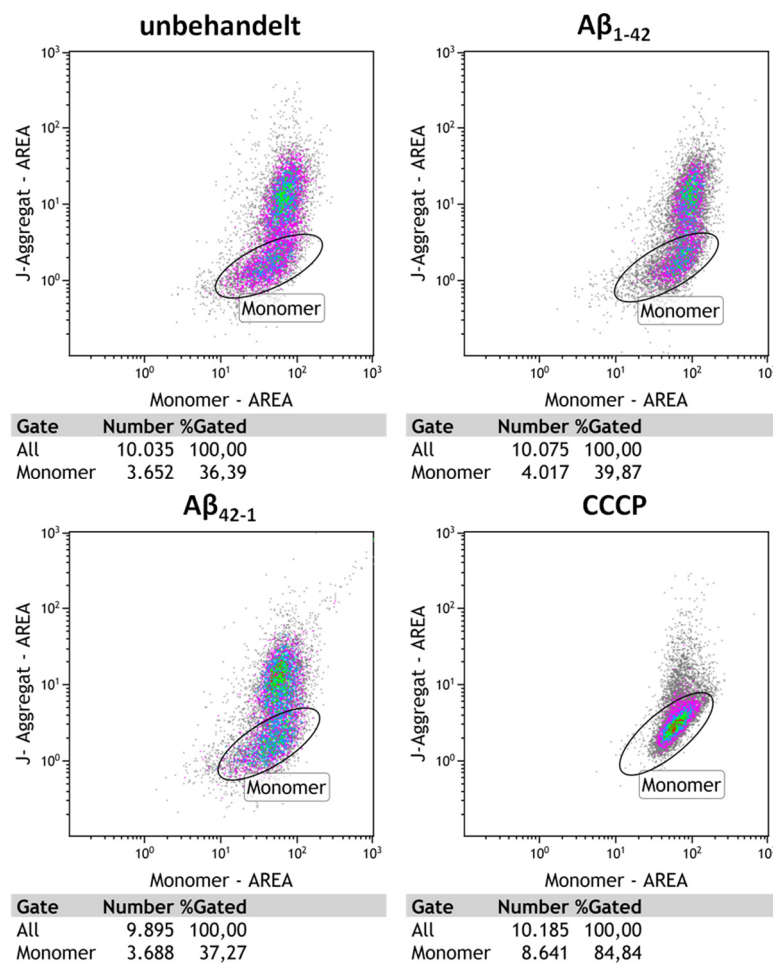


G In-Lösung Citrat-Synthase Aktivitätstest (links Zelllysate, rechts isolierte Mitochondrien)



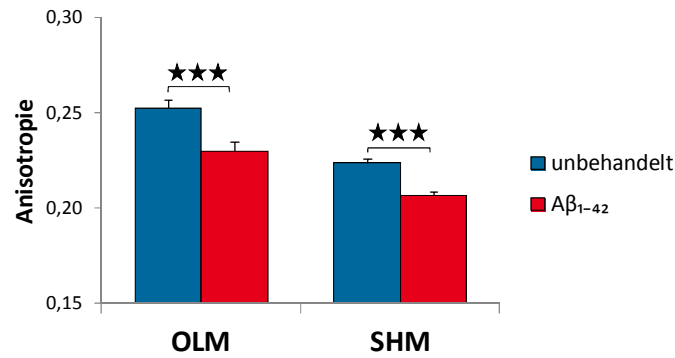
7.10 Ermittlung des mitochondrialen Membranpotenzials

Eine Quantifizierung des Monomer- und J-Aggregat-Anteils ist mittels Durchflusszytometrie möglich (siehe 4.12.1). SH-SY5Y Zellen, unbehandelt oder für 24 h behandelt mit 2,0 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ bzw. $\text{A}\beta_{42-1}$, wurden deshalb hinsichtlich des JC-1 Monomers analysiert. Der verwendete 488 nm Laser (100 mW) regte ebenfalls das J-Aggregat an. Es wurden trotz Kompensation (20,20% in FL3) keine klar voneinander abzutrennenden Zellpopulationen für das Monomer und das J-Aggregat (2. Zellpopulation) erhalten, wodurch eine Quantifizierung nicht möglich war. CCCP-behandelte Zellen zeigten eine fast vollständige Eliminierung des MMP.



7.11 "Fluidität" der Mitochondrienmembran

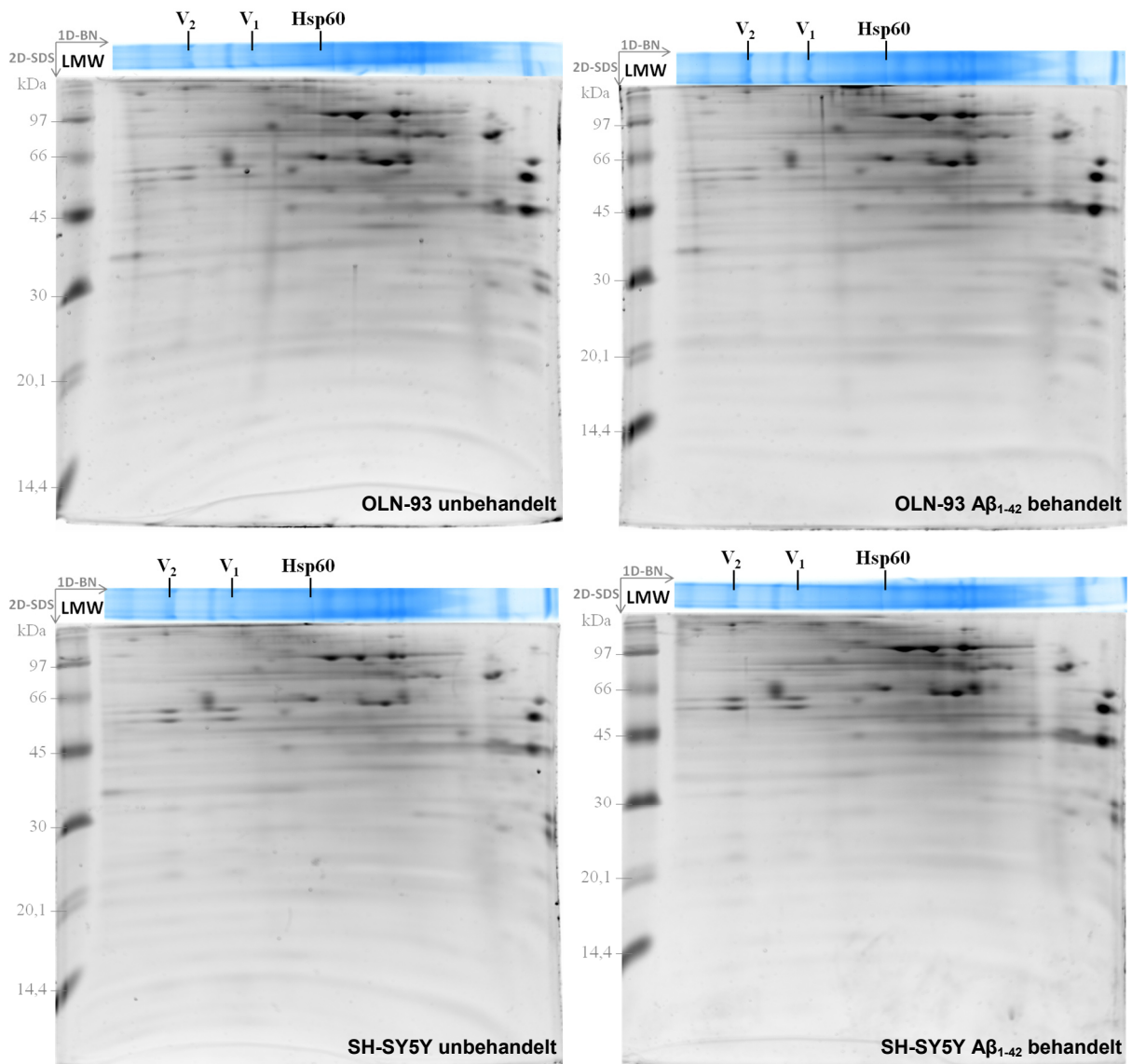
Die *steady-state* Fluoreszenzanisotropie wurde von der in die Mitochondrienmembranen von OLM und SHM interkalierten Fluoreszenzsonde DPH gemessen (siehe 4.19). Auch das zweite Experiment zeigte eine Abnahme der DPH Anisotropie nach A β_{1-42} Behandlung, was auf eine Zunahme der "Fluidität" der Mitochondrienmembran schließen ließ.



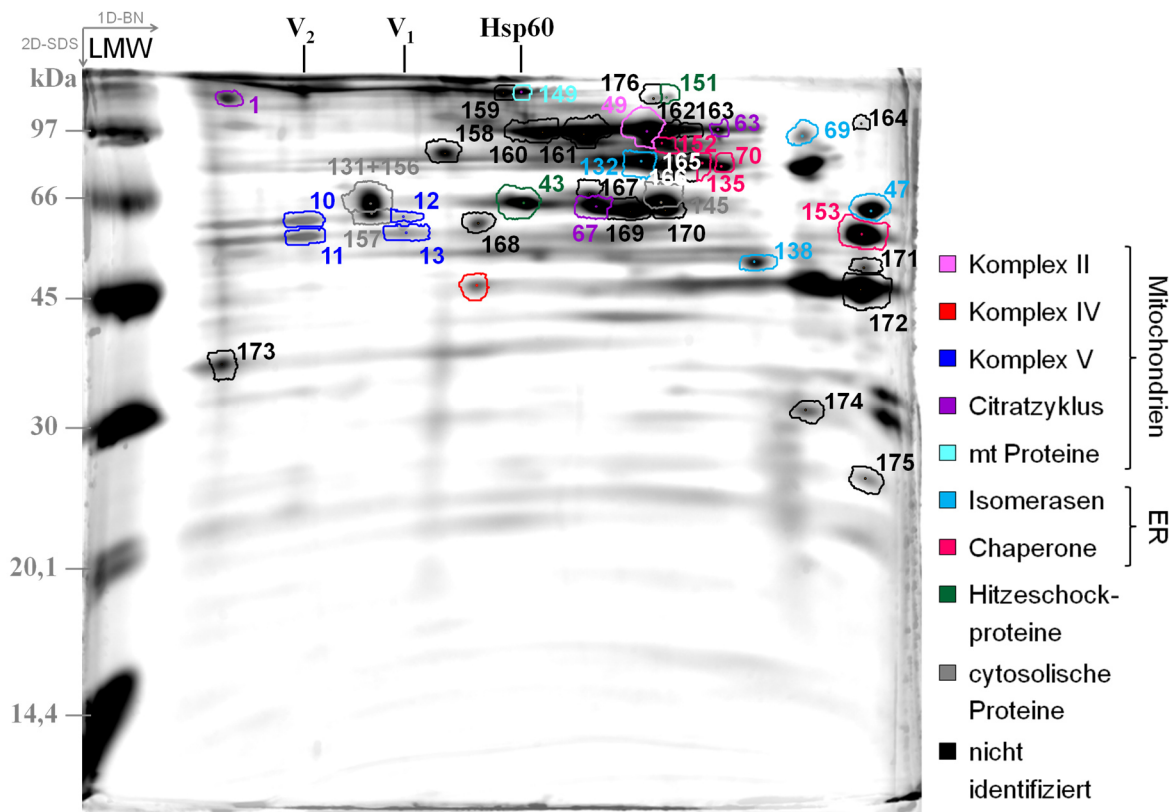
7.12 Quantitative Proteomanalyse: unbehandelt vs. A β -behandelt

Solubilisierte Mitochondrienproteine wurden in einer 2D-BN/SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.21.3) und mittels SYPRO® Ruby gefärbt (siehe 4.26.3). Abbildung A zeigt repräsentative SYPRO® Ruby gefärbte 2D-Gele, anhand denen die quantitative Proteomanalyse mittels der Software Delta2D durchgeführt wurde. Auf den Fusionsgelen in Abbildung B sind die für die Quantifizierung herangezogenen Proteinspots markiert (Proteinennamen zu den Spotnummern können Tab. 26 und Tab. 27 sowie Kratochwil [311] entnommen werden). Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle C dargestellt.

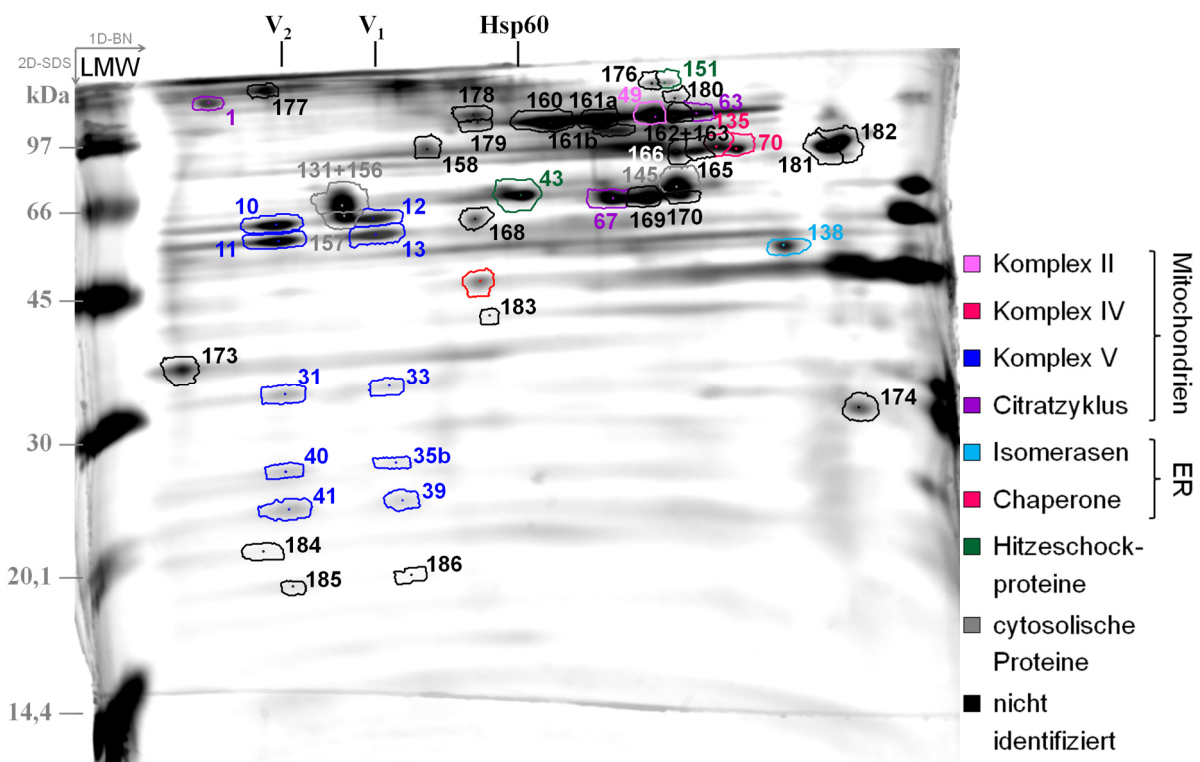
A Repräsentative SYPRO® gefärbte 2D-Gele



B Fusionsgel von OLN-93 Proben (n = 3 für A β -behandelt und unbehandelt)



Fusionsgel von SH-SY5Y Proben (n = 4 für A β -behandelt und unbehandelt)



C Ergebnisse der Quantifizierung: unbehandelt vs. Aβ₁₋₄₂-behandelt

Die Abkürzung "n. a." steht für nicht auswertbar.

Nr.	Proteinname	OLN-93		SH-SY5Y	
		Änderung [%]	p-Wert	Änderung [%]	p-Wert
49	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	-7,48	0,343	+19,66	0,094
O	Cytochrome c oxidase subunit 1	+1,81	0,840	-6,10	0,454
10	ATP synthase subunit alpha	-27,55	0,039	+19,01	0,033
11	ATP synthase subunit beta	-24,94	0,008	+16,07	0,069
12	ATP synthase subunit alpha	-33,88	0,051	-1,68	0,823
13	ATP synthase subunit beta	-30,09	0,021	-9,10	0,383
31	ATP synthase subunit gamma	n. a.	-	+12,37	0,178
33	ATP synthase subunit gamma	n. a.	-	+41,08	0,038
35b	ATP synthase subunit b	n. a.	-	+19,46	0,392
39	ATP synthase subunit O	n. a.	-	+12,36	0,398
40	ATP synthase F(0) complex subunit B1	n. a.	-	-15,56	0,215
41	ATP synthase subunit O	n. a.	-	+13,81	0,309
1	2-oxoglutarate dehydrogenase	-15,57	0,272	-5,08	0,654
63	Aconitate hydratase	+17,59	0,623	+0,99	0,933
67	Pyruvate kinase PKM	-12,68	0,091	+3,55	0,397
149	NAD(P) transhydrogenase	+84,18	0,272	n. a.	-
47	Protein disulfide-isomerase	+6,11	0,674	n. a.	-
69	Protein disulfide-isomerase A4	-4,73	0,743	n. a.	-
132	Protein disulfide-isomerase A	-9,24	0,134	n. a.	-
138	Protein disulfide-isomerase A6	-14,90	0,192	+1,39	0,855
70	78 kDa glucose-regulated protein	-15,60	0,220	+4,85	0,602
135	78 kDa glucose-regulated protein	-18,25	0,214	+1,91	0,776
152	Calnexin	-0,64	0,966	n. a.	-
153	Calreticulin	+5,79	0,515	n. a.	-
43	60 kDa heat shock protein	-9,32	0,191	-10,42	0,085
151	Endoplasmic	-22,45	0,210	-15,20	0,487
145	WD repeat-containing protein 1	-4,00	0,501	+22,45	0,003
157	T-complex protein 1 subunit beta	+0,18	0,988	-7,61	0,310
131	T-complex protein 1 subunit alpha	-1,34	0,910	+2,49	0,728
+156	T-complex protein 1 subunit theta				
158	Nicht identifiziert	-9,72	0,410	-15,00	0,163
159	Nicht identifiziert	+37,56	0,376	n. a.	-
160	Nicht identifiziert	+34,87	0,174	+22,02	0,009
161	Nicht identifiziert	+1,50	0,871	n. a.	-
161a	Nicht identifiziert	n. a.	-	+17,86	0,139
161b	Nicht identifiziert	n. a.	-	+15,68	0,221
162	Nicht identifiziert	+9,24	0,439	n. a.	-
162	Nicht identifiziert	n. a.	-	-27,21	0,019
+163					
163	Nicht identifiziert	-2,83	0,847	n. a.	-

Nr.	Proteinname	OLN-93		SH-SY5Y	
		Änderung [%]	p-Wert	Änderung [%]	p-Wert
164	Nicht identifiziert	+18,88	0,563	n. a.	-
165	Nicht identifiziert	-9,60	0,407	-1,20	0,921
166	Nicht identifiziert	-3,23	0,464	-2,08	0,770
167	Nicht identifiziert	-17,38	0,274	n. a.	-
168	Nicht identifiziert	-22,16	0,057	-25,49	0,014
169	Nicht identifiziert	-8,89	0,265	+13,37	0,001
170	Nicht identifiziert	-4,57	0,439	+16,36	0,235
171	Nicht identifiziert	+5,56	0,748	n. a.	-
172	Nicht identifiziert	+12,53	0,111	n. a.	-
173	Nicht identifiziert	-7,53	0,476	-0,84	0,885
174	Nicht identifiziert	-0,31	0,976	-5,06	0,094
175	Nicht identifiziert	-0,69	0,953	n. a.	-
176	Nicht identifiziert	-17,40	0,368	+84,67	0,007
177	Nicht identifiziert	n. a.	-	+10,02	0,299
178	Nicht identifiziert	n. a.	-	+23,72	0,025
179	Nicht identifiziert	n. a.	-	+13,65	0,101
180	Nicht identifiziert	n. a.	-	-6,63	0,626
181	Nicht identifiziert	n. a.	-	+11,92	0,156
182	Nicht identifiziert	n. a.	-	+1,72	0,880
183	Nicht identifiziert	n. a.	-	+46,15	0,127
184	Nicht identifiziert	n. a.	-	-41,89	0,005
185	Nicht identifiziert	n. a.	-	-23,49	0,302
186	Nicht identifiziert	n. a.	-	-2,77	0,848

8 Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

1. Glenner G.G. and Wong C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.
2. Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., *et al.* (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249.
3. Ferreira S.T. and Klein W.L. (2011) The Abeta oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* 96:529-543.
4. Wang X., Su B., Perry G., *et al.* (2007) Insights into amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 43:1569-1573.
5. Larson M.E. and Lesne S.E. (2012) Soluble Abeta oligomer production and toxicity. *J Neurochem* 120 Suppl 1:125-139.
6. Lustbader J.W., Cirilli M., Lin C., *et al.* (2004) ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304:448-452.
7. Fernandez-Vizarra P., Fernandez A.P., Castro-Blanco S., *et al.* (2004) Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Histol Histopathol* 19:823-844.
8. Burdick D., Soreghan B., Kwon M., *et al.* (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 267:546-554.
9. Pinho C.M., Teixeira P.F. and Glaser E. (2014) Mitochondrial import and degradation of amyloid-beta peptide. *Biochim Biophys Acta* 1837:1069-1074.
10. Hauptmann S., Scherping I., Drose S., *et al.* (2009) Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. *Neurobiol Aging* 30:1574-1586.
11. World Alzheimer Report 2015 - The Global Impact of Dementia. *Alzheimer's Disease International* (2015), London.
12. Demenz-Report. *Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung* (2011), Berlin.
13. Weyerer S. (2005) Alzheimers. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 28. *Robert Koch-Institut*, Berlin.
14. Demenzstatistik weltweit. <http://danablog.org/2015/08/31/from-the-archives-reducing-risks-of-alzheimers/> (Stand: 19.11.2015).
15. Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. *Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.* (2014), Berlin.
16. Europäische Feldstudie. <http://www.alzheimer-europe.org/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Prevalence-of-dementia/Prevalence-of-dementia-in-Europe> (Stand: 19.11.2015).
17. Die Diagnose der Alzheimer-Krankheit und anderer Demenzerkrankungen. *Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.* (2012), Berlin.
18. Hirnareale. https://www.alzheimers.org.uk/site/scripts/documents_info.php?documentID=114 (Stand: 20.11.2015).
19. AD Hirn. https://www.alzheimer-forschung.de/images/user-images/alzheimer-krankheit/illustrationen/Veränderungen_im_Laufe_der_Alzheimer-Krankheit_gross.jpg (Stand: 20.11.2015).
20. Maurer U. and Maurer K. (1999) Alzheimer: das Leben eines Arztes und die Karriere einer Krankheit, 2. Auflage. *Piper Verlag*, München.
21. Alzheimer A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie* 64:146-148.
22. Goedert M., Wischik C.M., Crowther R.A., *et al.* (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4051-4055.
23. Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y.C., *et al.* (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917.
24. Ihara Y., Nukina N., Miura R., *et al.* (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem* 99:1807-1810.
25. Haass C. and Selkoe D.J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112.

26. Chen F., David D., Ferrari A., *et al.* (2004) Posttranslational modifications of tau--role in human tauopathies and modeling in transgenic animals. *Curr Drug Targets* 5:503-515.
27. Gotz J., Probst A., Spillantini M.G., *et al.* (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J* 14:1304-1313.
28. Tanzi R.E., Gusella J.F., Watkins P.C., *et al.* (1987) Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235:880-884.
29. Sandbrink R., Masters C.L. and Beyreuther K. (1994) Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem* 269:1510-1517.
30. Zhang H., Ma Q., Zhang Y.W., *et al.* (2012) Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* 120 Suppl 1:9-21.
31. Kinoshita A., Fukumoto H., Shah T., *et al.* (2003) Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci* 116:3339-3346.
32. Xu H., Greengard P. and Gandy S. (1995) Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 270:23243-23245.
33. Mizuguchi M., Ikeda K. and Kim S.U. (1992) Differential distribution of cellular forms of beta-amyloid precursor protein in murine glial cell cultures. *Brain Res* 584:219-225.
34. Breen K.C., Bruce M. and Anderton B.H. (1991) Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J Neurosci Res* 28:90-100.
35. Sabo S.L., Ikin A.F., Buxbaum J.D., *et al.* (2001) The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol* 153:1403-1414.
36. Hardy J. and Selkoe D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
37. Querfurth H.W. and LaFerla F.M. (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362:329-344.
38. LaFerla F.M., Green K.N. and Oddo S. (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8:499-509.
39. Buxbaum J.D., Liu K.N., Luo Y., *et al.* (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273:27765-27767.
40. Koike H., Tomioka S., Sorimachi H., *et al.* (1999) Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 343 Pt 2:371-375.
41. Lammich S., Kojro E., Postina R., *et al.* (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922-3927.
42. Chantry A. and Glynn P. (1990) A novel metalloproteinase originally isolated from brain myelin membranes is present in many tissues. *Biochem J* 268:245-248.
43. Howard L., Lu X., Mitchell S., *et al.* (1996) Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J* 317 (Pt 1):45-50.
44. Furukawa K., Barger S.W., Blalock E.M., *et al.* (1996) Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 379:74-78.
45. Furukawa K., Sopher B.L., Rydel R.E., *et al.* (1996) Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67:1882-1896.
46. Mattson M.P., Cheng B., Culwell A.R., *et al.* (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10:243-254.
47. Mattson M.P. (1997) Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77:1081-1132.
48. Sinha S., Anderson J.P., Barbour R., *et al.* (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540.
49. Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., *et al.* (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.
50. Yan R., Bienkowski M.J., Shuck M.E., *et al.* (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402:533-537.
51. Walter J., Fluhrer R., Hartung B., *et al.* (2001) Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* 276:14634-14641.

52. BACE1 Lokalisation. <http://www.uniprot.org/uniprot/P56817> (Stand: 21.01.2016).
53. Ehehalt R., Michel B., De Pietri Tonelli D., *et al.* (2002) Splice variants of the beta-site APP-cleaving enzyme BACE1 in human brain and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 293:30-37.
54. Cordy J.M., Hussain I., Dingwall C., *et al.* (2003) Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11735-11740.
55. Ehehalt R., Keller P., Haass C., *et al.* (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160:113-123.
56. Tun H., Marlow L., Pinnix I., *et al.* (2002) Lipid rafts play an important role in A beta biogenesis by regulating the beta-secretase pathway. *J Mol Neurosci* 19:31-35.
57. Vetrivel K.S., Cheng H., Lin W., *et al.* (2004) Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem* 279:44945-44954.
58. Acquati F., Accarino M., Nucci C., *et al.* (2000) The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS Lett* 468:59-64.
59. Xin H., Stephans J.C., Duan X., *et al.* (2000) Identification of a novel aspartic-like protease differentially expressed in human breast cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1501:125-137.
60. Farzan M., Schnitzler C.E., Vasilieva N., *et al.* (2000) BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9712-9717.
61. Laird F.M., Cai H., Savonenko A.V., *et al.* (2005) BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25:11693-11709.
62. Nikolaev A., McLaughlin T., O'Leary D.D., *et al.* (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457:981-989.
63. Kim D. and Tsai L.H. (2009) Bridging physiology and pathology in AD. *Cell* 137:997-1000.
64. Vetrivel K.S., Zhang Y.W., Xu H., *et al.* (2006) Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener* 1:4.
65. Shirotani K., Edbauer D., Kostka M., *et al.* (2004) Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1. *J Neurochem* 89:1520-1527.
66. Wolfe M.S., Xia W., Ostaszewski B.L., *et al.* (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398:513-517.
67. Figueroa D.J., Morris J.A., Ma L., *et al.* (2002) Presenilin-dependent gamma-secretase activity modulates neurite outgrowth. *Neurobiol Dis* 9:49-60.
68. Luo W.J., Wang H., Li H., *et al.* (2003) PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem* 278:7850-7854.
69. Fortna R.R., Crystal A.S., Morais V.A., *et al.* (2004) Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 279:3685-3693.
70. Lee S.F., Shah S., Li H., *et al.* (2002) Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch. *J Biol Chem* 277:45013-45019.
71. Muller T., Meyer H.E., Egensperger R., *et al.* (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 85:393-406.
72. Haass C., Lemere C.A., Capell A., *et al.* (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1:1291-1296.
73. Guo Q., Fu W., Sopher B.L., *et al.* (1999) Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat Med* 5:101-106.
74. Jankowsky J.L., Fadale D.J., Anderson J., *et al.* (2004) Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* 13:159-170.
75. Swerdlow R.H. (2007) Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2:347-359.
76. Gouras G.K., Tsai J., Naslund J., *et al.* (2000) Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 156:15-20.
77. Shao H., Jao S., Ma K., *et al.* (1999) Solution structures of micelle-bound amyloid beta-(1-40) and beta-(1-42) peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol* 285:755-773.

78. Walti M.A., Orts J., Vogeli B., *et al.* (2015) Solution NMR studies of recombinant Abeta(1-42): from the presence of a micellar entity to residual beta-sheet structure in the soluble species. *Chembiochem* 16:659-669.
79. Luhers T., Ritter C., Adrian M., *et al.* (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17342-17347.
80. Olofsson A., Lindhagen-Persson M., Sauer-Eriksson A.E., *et al.* (2007) Amide solvent protection analysis demonstrates that amyloid-beta(1-40) and amyloid-beta(1-42) form different fibrillar structures under identical conditions. *Biochem J* 404:63-70.
81. APP AS-Sequenz. <http://www.uniprot.org/uniprot/P05067> (Stand: 03.11.2015).
82. Mori H., Takio K., Ogawara M., *et al.* (1992) Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 267:17082-17086.
83. Naslund J., Schierhorn A., Hellman U., *et al.* (1994) Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8378-8382.
84. Saido T.C., Iwatsubo T., Mann D.M., *et al.* (1995) Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14:457-466.
85. Gunn A.P., Masters C.L. and Cherny R.A. (2010) Pyroglutamate-Abeta: role in the natural history of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1915-1918.
86. Cynis H., Rahfeld J.U., Stephan A., *et al.* (2008) Isolation of an isoenzyme of human glutaminyl cyclase: retention in the Golgi complex suggests involvement in the protein maturation machinery. *J Mol Biol* 379:966-980.
87. Schilling S., Hoffmann T., Manhart S., *et al.* (2004) Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett* 563:191-196.
88. He W. and Barrow C.J. (1999) The A beta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry* 38:10871-10877.
89. Schilling S., Lauber T., Schaupp M., *et al.* (2006) On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* 45:12393-12399.
90. Pike C.J., Overman M.J. and Cotman C.W. (1995) Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J Biol Chem* 270:23895-23898.
91. Schilling S., Zeitschel U., Hoffmann T., *et al.* (2008) Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med* 14:1106-1111.
92. McColl G., Roberts B.R., Gunn A.P., *et al.* (2009) The *Caenorhabditis elegans* A beta 1-42 model of Alzheimer disease predominantly expresses A beta 3-42. *J Biol Chem* 284:22697-22702.
93. Harigaya Y., Saido T.C., Eckman C.B., *et al.* (2000) Amyloid beta protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun* 276:422-427.
94. Allsop D., Wong C.W., Ikeda S., *et al.* (1988) Immunohistochemical evidence for the derivation of a peptide ligand from the amyloid beta-protein precursor of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2790-2794.
95. Selkoe D.J. (1989) Amyloid beta protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cell* 58:611-612.
96. Hardy J.A. and Higgins G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.
97. Terry R.D., Masliah E., Salmon D.P., *et al.* (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580.
98. Hulette C.M., Welsh-Bohmer K.A., Murray M.G., *et al.* (1998) Neuropathological and neuropsychological changes in "normal" aging: evidence for preclinical Alzheimer disease in cognitively normal individuals. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:1168-1174.
99. Ono K. and Yamada M. (2011) Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 117:19-28.
100. Jin M., Shepardson N., Yang T., *et al.* (2011) Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5819-5824.
101. Walsh D.M. and Selkoe D.J. (2007) A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101:1172-1184.
102. Penke B., Toth A.M., Foldi I., *et al.* (2012) Intraneuronal beta-amyloid and its interactions with proteins and subcellular organelles. *Electrophoresis* 33:3608-3616.

103. Walsh D.M., Tseng B.P., Rydel R.E., *et al.* (2000) The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39:10831-10839.
104. Kang J.E., Lim M.M., Bateman R.J., *et al.* (2009) Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science* 326:1005-1007.
105. Zhao L.N., Long H., Mu Y., *et al.* (2012) The toxicity of amyloid beta oligomers. *Int J Mol Sci* 13:7303-7327.
106. Nagele R.G., D'Andrea M.R., Anderson W.J., *et al.* (2002) Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 110:199-211.
107. D'Andrea M.R. and Nagele R.G. (2006) Targeting the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor to reduce amyloid accumulation in Alzheimer's disease pyramidal neurons. *Curr Pharm Des* 12:677-684.
108. Fuentealba R.A., Liu Q., Zhang J., *et al.* (2010) Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates neuronal Abeta42 uptake and lysosomal trafficking. *PLoS One* 5:e11884.
109. Takuma K., Fang F., Zhang W., *et al.* (2009) RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20021-20026.
110. Gyllys K.H., Fein J.A., Yang F., *et al.* (2007) Increased cholesterol in Abeta-positive nerve terminals from Alzheimer's disease cortex. *Neurobiol Aging* 28:8-17.
111. Kawarabayashi T., Shoji M., Younkin L.H., *et al.* (2004) Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:3801-3809.
112. Fonseca A.C., Ferreira E., Oliveira C.R., *et al.* (2013) Activation of the endoplasmic reticulum stress response by the amyloid-beta 1-40 peptide in brain endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1832:2191-2203.
113. Schnabel J. (2011) Amyloid: little proteins, big clues. *Nature* 475:S12-14.
114. Gregori L., Fuchs C., Figueiredo-Pereira M.E., *et al.* (1995) Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. *J Biol Chem* 270:19702-19708.
115. Pagani L. and Eckert A. (2011) Amyloid-Beta interaction with mitochondria. *Int J Alzheimers Dis* 2011:925050.
116. Stahl A., Moberg P., Ytterberg J., *et al.* (2002) Isolation and identification of a novel mitochondrial metalloprotease (PreP) that degrades targeting presequences in plants. *J Biol Chem* 277:41931-41939.
117. Taylor S.W., Fahy E., Zhang B., *et al.* (2003) Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* 21:281-286.
118. Falkevall A., Alikhani N., Bhushan S., *et al.* (2006) Degradation of the amyloid beta-protein by the novel mitochondrial peptidase, PreP. *J Biol Chem* 281:29096-29104.
119. Sudoh S., Frosch M.P. and Wolf B.A. (2002) Differential effects of proteases involved in intracellular degradation of amyloid beta-protein between detergent-soluble and -insoluble pools in CHO-695 cells. *Biochemistry* 41:1091-1099.
120. Mawuenyega K.G., Sigurdson W., Ovod V., *et al.* (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330:1774.
121. Caccamo A., Oddo S., Sugarman M.C., *et al.* (2005) Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol Aging* 26:645-654.
122. Kim M., Hersh L.B., Leissring M.A., *et al.* (2007) Decreased catalytic activity of the insulin-degrading enzyme in chromosome 10-linked Alzheimer disease families. *J Biol Chem* 282:7825-7832.
123. Zhao Z., Xiang Z., Haroutunian V., *et al.* (2007) Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28:824-830.
124. Gotz J., Streffer J.R., David D., *et al.* (2004) Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol Psychiatry* 9:664-683.
125. Ittner L.M. and Gotz J. (2011) Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12:65-72.
126. LaFerla F.M. and Oddo S. (2005) Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 11:170-176.
127. Melov S., Adlard P.A., Morten K., *et al.* (2007) Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS One* 2:e536.
128. Su B., Wang X., Lee H.G., *et al.* (2010) Chronic oxidative stress causes increased tau phosphorylation in M17 neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 468:267-271.

129. Mairet-Coello G., Courchet J., Pieraut S., *et al.* (2013) The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of Abeta oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron* 78:94-108.
130. Santacruz K., Lewis J., Spire T., *et al.* (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481.
131. Spuch C., Ortolano S. and Navarro C. (2012) New insights in the amyloid-Beta interaction with mitochondria. *J Aging Res* 2012:324968.
132. Vershinin M., Carter B.C., Razafsky D.S., *et al.* (2007) Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:87-92.
133. Tatebayashi Y., Haque N., Tung Y.C., *et al.* (2004) Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport. *J Cell Sci* 117:1653-1663.
134. Ebner A., Godemann R., Stamer K., *et al.* (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143:777-794.
135. DuBoff B., Feany M. and Gotz J. (2013) Why size matters - balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 36:325-335.
136. Sheng B., Wang X., Su B., *et al.* (2012) Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 120:419-429.
137. Scheffler I.E. (1999) Mitochondria, 1. edition. *Wiley-Liss, Inc*, USA.
138. Alberts B., Johnson A. and Lewis J. (2002) Molecular Biology of the Cell, 4th edition. *Garland Science*, New York (USA).
139. Alberts B., Bray D., Hopkins K., *et al.* (2005) Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 3. Auflage. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA*, Weinheim.
140. Scatena R., Bottoni P. and Giardina B. (2012) Advances in Mitochondrial Medicine, 1. edition. *Springer Science+Business Media B.V.*, Heidelberg.
141. Acin-Perez R. and Enriquez J.A. (2014) The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta* 1837:444-450.
142. Schafer E., Seelert H., Reifschneider N.H., *et al.* (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281:15370-15375.
143. Seelert H., Dani D.N., Dante S., *et al.* (2009) From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. *Biochim Biophys Acta* 1787:657-671.
144. Perry S.W., Norman J.P., Barbieri J., *et al.* (2011) Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 50:98-115.
145. Halliwell B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312-322.
146. Li X.X., Tsoi B., Li Y.F., *et al.* (2015) Cardiolipin and its different properties in mitophagy and apoptosis. *J Histochem Cytochem* 63:301-311.
147. Cosentino K. and Garcia-Saez A.J. (2014) Mitochondrial alterations in apoptosis. *Chem Phys Lipids* 181:62-75.
148. Chang S., ran Ma T., Miranda R.D., *et al.* (2005) Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18694-18699.
149. Schon E.A. and Area-Gomez E. (2010) Is Alzheimer's disease a disorder of mitochondria-associated membranes? *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2:S281-292.
150. Anandatheerthavarada H.K., Biswas G., Robin M.A., *et al.* (2003) Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol* 161:41-54.
151. Hansson Petersen C.A., Alikhani N., Behbahani H., *et al.* (2008) The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13145-13150.
152. Area-Gomez E., de Groof A.J., Boldogh I., *et al.* (2009) Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *Am J Pathol* 175:1810-1816.
153. McMahon K.A., Zhu M., Kwon S.W., *et al.* (2006) Detergent-free caveolae proteome suggests an interaction with ER and mitochondria. *Proteomics* 6:143-152.
154. Hayashi T. and Fujimoto M. (2010) Detergent-resistant microdomains determine the localization of sigma-1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction. *Mol Pharmacol* 77:517-528.

155. Glabe C.G. and Kaye R. (2006) Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. *Neurology* 66:S74-78.
156. Reddy P.H. and Beal M.F. (2008) Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 14:45-53.
157. Chen H., Detmer S.A., Ewald A.J., *et al.* (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160:189-200.
158. Amiri M. and Hollenbeck P.J. (2008) Mitochondrial biogenesis in the axons of vertebrate peripheral neurons. *Dev Neurobiol* 68:1348-1361.
159. Wang X., Su B., Lee H.G., *et al.* (2009) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29:9090-9103.
160. Wang X., Su B., Siedlak S.L., *et al.* (2008) Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19318-19323.
161. Manczak M., Calkins M.J. and Reddy P.H. (2011) Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20:2495-2509.
162. Trushina E., Nemutlu E., Zhang S., *et al.* (2012) Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PLoS One* 7:e32737.
163. Rhein V., Song X., Wiesner A., *et al.* (2009) Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20057-20062.
164. Yao J., Irwin R.W., Zhao L., *et al.* (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14670-14675.
165. Manczak M. and Reddy P.H. (2012) Abnormal interaction of VDAC1 with amyloid beta and phosphorylated tau causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 21:5131-5146.
166. Du H., Guo L., Fang F., *et al.* (2008) Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med* 14:1097-1105.
167. Du H., Guo L., Zhang W., *et al.* (2011) Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model. *Neurobiol Aging* 32:398-406.
168. Sastre J., Millan A., Garcia de la Asuncion J., *et al.* (1998) A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 24:298-304.
169. Swerdlow R.H. and Khan S.M. (2004) A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* 63:8-20.
170. Zhu X., Perry G., Moreira P.I., *et al.* (2006) Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 9:147-153.
171. Zhu X., Smith M.A., Perry G., *et al.* (2004) Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 19:345-352.
172. Alikhani N., Guo L., Yan S., *et al.* (2011) Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid-beta degrading enzyme, PreP peptidase, in Alzheimer's disease brain mitochondria. *J Alzheimers Dis* 27:75-87.
173. Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300.
174. Harman D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20:145-147.
175. Harman D. (2006) Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 1067:10-21.
176. Beckman K.B. and Ames B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547-581.
177. Lenaz G. (2012) Mitochondria and Reactive Oxygen Species. Which Role in Physiology and Pathology? Kapitel 5 in *Advances in Mitochondrial Medicine*, Scatena R., Bottoni P. and Giardina B. *Springer Science+Business Media B.V.*, Heidelberg.
178. Mao P. and Reddy P.H. (2011) Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 1812:1359-1370.
179. Butterfield D.A., Perluigi M. and Sultana R. (2006) Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics. *Eur J Pharmacol* 545:39-50.
180. Yang S.Y., He X.Y., Isaacs C., *et al.* (2014) Roles of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in neurodegenerative disorders. *J Steroid Biochem Mol Biol* 143:460-472.

181. Kristofikova Z., Bockova M., Hegnerova K., *et al.* (2009) Enhanced levels of mitochondrial enzyme 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in patients with Alzheimer disease and multiple sclerosis. *Mol Biosyst* 5:1174-1179.
182. Yao J., Du H., Yan S., *et al.* (2011) Inhibition of amyloid-beta (Abeta) peptide-binding alcohol dehydrogenase-Abeta interaction reduces Abeta accumulation and improves mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31:2313-2320.
183. Bertram L. and Tanzi R.E. (2005) The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 115:1449-1457.
184. Die medikamentöse Behandlung der Demenz. *Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.* (2012), Berlin.
185. Gruninger-Leitch F., Schlatter D., Kung E., *et al.* (2002) Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases. *J Biol Chem* 277:4687-4693.
186. Kreft A.F., Martone R. and Porte A. (2009) Recent advances in the identification of gamma-secretase inhibitors to clinically test the Abeta oligomer hypothesis of Alzheimer's disease. *J Med Chem* 52:6169-6188.
187. Mangialasche F., Solomon A., Winblad B., *et al.* (2010) Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* 9:702-716.
188. Lemere C.A. (2013) Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles. *Mol Neurodegener* 8:36.
189. Biedler J.L., Roffler-Tarlov S., Schachner M., *et al.* (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38:3751-3757.
190. Roth A.D., Ramirez G., Alarcon R., *et al.* (2005) Oligodendrocytes damage in Alzheimer's disease: beta amyloid toxicity and inflammation. *Biol Res* 38:381-387.
191. Nielsen K. and Peters A. (2000) The effects of aging on the frequency of nerve fibers in rhesus monkey striate cortex. *Neurobiol Aging* 21:621-628.
192. Sloane J.A., Hinman J.D., Lubonia M., *et al.* (2003) Age-dependent myelin degeneration and proteolysis of oligodendrocyte proteins is associated with the activation of calpain-1 in the rhesus monkey. *J Neurochem* 84:157-168.
193. Tanaka J., Okuma Y., Tomobe K., *et al.* (2005) The age-related degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse (SAM) P8: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Pharm Bull* 28:615-618.
194. Bartzokis G. (2004) Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:5-18; author reply 49-62.
195. Bartzokis G., Sultzer D., Lu P.H., *et al.* (2004) Heterogeneous age-related breakdown of white matter structural integrity: implications for cortical "disconnection" in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:843-851.
196. Curtain C.C., Ali F., Volitakis I., *et al.* (2001) Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J Biol Chem* 276:20466-20473.
197. Whitman G.T. and Cotman C.W. (2004) Oligodendrocyte degeneration in AD. *Neurobiol Aging* 25:33-36.
198. Subasinghe S., Unabia S., Barrow C.J., *et al.* (2003) Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Abeta peptides on vascular smooth muscle cells and for Abeta binding to vascular smooth muscle cell membranes. *J Neurochem* 84:471-479.
199. Xu J., Chen S., Ahmed S.H., *et al.* (2001) Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. *J Neurosci* 21:RC118.
200. Richter-Landsberg C. and Heinrich M. (1996) OLN-93: a new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures. *J Neurosci Res* 45:161-173.
201. Dubois-Dalcq M., Behar T., Hudson L., *et al.* (1986) Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* 102:384-392.
202. Keilhauer G., Faissner A. and Schachner M. (1985) Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* 316:728-730.
203. Noble M., Albrechtsen M., Moller C., *et al.* (1985) Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro. *Nature* 316:725-728.
204. Noble M., Fok-Seang J., Wolswijk G., *et al.* (1990) Development and regeneration in the central nervous system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 327:127-143.
205. Biedler J.L., Helson L. and Spengler B.A. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33:2643-2652.

206. Fagerstrom S., Pahlman S., Gestblom C., *et al.* (1996) Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* 7:775-785.
207. SH-SY5Y (ATCC® CRL2266™). http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2266.aspx?geo_country=de#generalinformation (Stand: 12.10.2015).
208. Lindl T. and Gstraunthaler G. (2008) Zell- und Gewebekultur, 6. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
209. Schmitz S. (2011) Der Experimentator Zellkultur, 3. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
210. Kim E.-H. (2003) Die Rolle reaktiver Spezies beim zellulären Altern. Dissertation,
211. Product Brochure Scepter™ Cell Counter. *EMD Millipore Corporation* (2012), Billerica (USA).
212. User Guide Scepter™ Handheld Automated Cell Counter. *EMD Millipore Corporation* (2013), Billerica (USA).
213. Jansohn M. and Rothhämel S. (2012) Gentechnische Methoden, 5. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
214. jetPRIME *in vitro* DNA & siRNA transfection reagent protocol. *Polyplus-transfection S.A.* (2012), Illkirch (F).
215. Goldbaum O., Oppermann M., Handschuh M., *et al.* (2003) Proteasome inhibition stabilizes tau inclusions in oligodendroglial cells that occur after treatment with okadaic acid. *J Neurosci* 23:8872-8880.
216. Feng Z. and Porter A.G. (1999) NF-kappaB/Rel proteins are required for neuronal differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 274:30341-30344.
217. Jao S.C., Ma K., Talafous J., *et al.* (1997) Trifluoroacetic acid pretreatment reproducibly disaggregates the amyloid b-peptide. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 4:240-252.
218. Repetto G., del Peso A. and Zurita J.L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3:1125-1131.
219. Winckler J. (1974) [Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red (author's transl)]. *Prog Histochem Cytochem* 6:1-91.
220. Nemes Z., Dietz R., Luth J.B., *et al.* (1979) The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia* 35:1475-1476.
221. alamarBlue. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/cell-proliferation-assay-protocols/cell-viability-with-alamarblue.html> (Stand: 25.10.2015).
222. alamarBlue Reaktion. <http://www.bmglabtech.com/en/applications/application-notes/195-alamarblue-assay-for-assessment-of-cell-proliferation-using-the-fluostar-optima-obj-91-804.html> (Stand: 10.10.2015).
223. Annexin V Apoptosis Detection Kit. *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* (2015), Dallas (USA).
224. Balasubramanian K. and Schroit A.J. (2003) Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu Rev Physiol* 65:701-734.
225. Gerke V., Creutz C.E. and Moss S.E. (2005) Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:449-461.
226. Apoptose+Nekrose. <http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Cytotox.html> (Stand: 10.10.2015).
227. Cossarizza A., Ferraresi R., Troiano L., *et al.* (2009) Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry. *Nat Protoc* 4:1790-1797.
228. Myhre O., Andersen J.M., Aarnes H., *et al.* (2003) Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 65:1575-1582.
229. Brubacher J.L. and Bols N.C. (2001) Chemically de-acetylated 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate as a probe of respiratory burst activity in mononuclear phagocytes. *J Immunol Methods* 251:81-91.
230. H2DCF-DA Reaktion. <http://link.springer.com/protocol/10.1385%2F1-59259-424-7%3A169#page-1> (Stand: 27.10.2015).
231. JC-1. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t4069?lang=de®ion=DE> (Stand: 10.10.2015).
232. Sakamuru S., Li X., Attene-Ramos M.S., *et al.* (2012) Application of a homogenous membrane potential assay to assess mitochondrial function. *Physiol Genomics* 44:495-503.
233. Luttmann W., Bratke K., Küpper M., *et al.* (2009) Der Experimentator Immunologie, 3. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.

234. Rahman M. (2009) Introduction to Flow Cytometry, 1. Auflage. *MorphoSys UK Ltd.*, Oxford (UK).
235. Pawley J.B. (2006) Handbook of biological confocal microscopy, 3. Auflage. *Springer*, Berlin.
236. CLSM. https://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5_8.htm (Stand: 24.10.2015).
237. Spinazzi M., Casarin A., Pertegato V., *et al.* (2012) Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc* 7:1235-1246.
238. Lottspeich F. (2006) Bioanalytik, 2. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, München.
239. Janssen A.J., Trijbels F.J., Sengers R.C., *et al.* (2007) Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin Chem* 53:729-734.
240. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
241. Compton S.J. and Jones C.G. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151:369-374.
242. Instructions for use - Roti-Nanoquant. *Carl Roth GmbH + Co. KG* (2015), Karlsruhe.
243. Luminescent ATP Detection Assay Kit. *Abcam plc.* (2012), Cambridge (UK).
244. Luciferase-Reaktion. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88291> (Stand: 18.10.2015).
245. Kern S. (2013) Biochemical and biophysical characterization of biological membranes. Master Thesis, Technische Universität Darmstadt.
246. Shinitzky M. and Barenholz Y. (1978) Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim Biophys Acta* 515:367-394.
247. Heyn M.P. (1979) Determination of lipid order parameters and rotational correlation times from fluorescence depolarization experiments. *FEBS Lett* 108:359-364.
248. Eckmann J., Clemens L.E., Eckert S.H., *et al.* (2014) Mitochondrial membrane fluidity is consistently increased in different models of Huntington disease: restorative effects of olesoxime. *Mol Neurobiol* 50:107-118.
249. DPH. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d208000?lang=de®ion=DE> (Stand: 17.10.2015).
250. Rehm H. and Letzel T. (2010) Der Experimentator Proteinchemie/Proteomics, 6. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
251. Detergents. *EMD Biosciences* (2007), San Diego.
252. Eubel H., Braun H.P. and Millar A.H. (2005) Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods* 1:11.
253. Krause F. and Seelert H. (2008) Detection and analysis of protein-protein interactions of organellar and prokaryotic proteomes by blue native and colorless native gel electrophoresis. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 14:Unit 14 11.
254. Digitonin. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/D141?lang=de®ion=DE&gclid=CIXWq5Dnvs_gCFQsUwwod5GcAYg (Stand: 13.10.2015).
255. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
256. Schagger H. and von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379.
257. PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26619> (Stand: 12.10.2015).
258. User Guide PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. *Thermo Fischer Scientific Inc.* (2010), USA.
259. User Guide MagicMark™ XP Western Protein Standard. *Invitrogen Corporation* (2005), USA.
260. Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26628> (Stand: 12.10.2015).
261. User Guide Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder. *Thermo Fisher Scientific Inc.* (2012), USA.
262. Schagger H. and von Jagow G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199:223-231.
263. Schagger H., Cramer W.A. and von Jagow G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217:220-230.
264. von Hagen J. (2008) Proteomics Sample Preparation, *Wiley-VCH Verlag*, Weinheim.

265. Reisinger V. and Eichacker L.A. (2006) Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE. *Proteomics* 6 Suppl 2:6-15.
266. User Guide Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis. *GE Healthcare UK Limited* (2014), UK.
267. Reisinger V. and Eichacker L.A. (2007) How to analyze protein complexes by 2D blue native SDS-PAGE. *Proteomics* 7 Suppl 1:6-16.
268. User Guide Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis. *GE Healthcare UK Limited* (2006), UK.
269. Grandier-Vazeille X. and Guerin M. (1996) Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes. *Anal Biochem* 242:248-254.
270. Sabar M., Balk J. and Leaver C.J. (2005) Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Plant J* 44:893-901.
271. NBT. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/n5514?lang=de®ion=DE> (Stand: 19.10.2015).
272. Heidrich N.G. (2011) Superkomplexe aus Algen und Cyanobakterien. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
273. DAB. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/32750?lang=de®ion=DE&gclid=COL55vGl0cgCFUS4Gwod9ckAxcg> (Stand: 20.10.2015).
274. Delta2D - Erste Schritte. *Decodon GmbH* (2011), Greifswald.
275. Delta2D - Manual. *Decodon GmbH* (2011), Greifswald.
276. Schagger H. and Pfeiffer K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19:1777-1783.
277. Marx S.-H. (2016) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von ATP-Synthasen und OxPhos Komplexen in Tieren und Pflanzen. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
278. DCPIP. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/33125?lang=de®ion=DE> (Stand: 18.10.2015).
279. DTNB. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8130?lang=de®ion=DE> (Stand: 18.10.2015).
280. Complex I Enzyme Activity Microplate Assay Kit. *Abcam plc.* (2012), Cambridge (UK).
281. Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
282. Gultekin H. and Heermann K.H. (1988) The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* 172:320-329.
283. Kyhse-Andersen J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10:203-209.
284. Haan C. and Behrmann I. (2007) A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods* 318:11-19.
285. Luttmann W., Bratke K., Küpper M., *et al.* (2009) Der Experimentator Immunologie, 3. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
286. User Guide OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit. *Millipore Corporation* (2009), Bellerica (USA).
287. Cheng X., Ahmadi F., Lapp B., *et al.* (2008) Methods for the detection of oxidative stress. *Millipore Corporation*, Bellerica (USA).
288. Neuhoff V., Arold N., Taube D., *et al.* (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-262.
289. Kang D., Gho Y.S., Suh M., *et al.* (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* 23:1511-1512.
290. Poehling H.-M. and Neuhoff V. (1981) Visualization of proteins with a silver "stain". A critical analysis. *Electrophoresis* 2:141-147.
291. Blum H., Beier H. and Gross H. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.

292. Lopez M.F., Berggren K., Chernokalskaya E., *et al.* (2000) A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* 21:3673-3683.
293. Berggren K., Chernokalskaya E., Steinberg T.H., *et al.* (2000) Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* 21:2509-2521.
294. Product Information Ponceau S Staining Solution. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/p7170pis.pdf (Stand: 14.10.2015).
295. Berth M., Moser F.M., Kolbe M., *et al.* (2007) The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:1223-1243.
296. Prespotted AnchorChip PAC II 384/96 HCCA. *Bruker Daltonik GmbH* (2012), Bremen.
297. Weiß C. (2013) Basiswissen Medizinische Statistik, 6. Auflage. *Springer Medizin*, Heidelberg.
298. Cavlovic L. (2015) Wirkung von ionisierender Strahlung auf Proteom und Lipidom sowie auf zelluläre und mitochondriale Aktivität. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
299. Frenzel M. (2011) Mitochondrial ageing in rat brain areas and human fibroblasts. Dissertation, Technische Universität.
300. Hofmann A.D., Beyer M., Krause-Buchholz U., *et al.* (2012) OXPHOS supercomplexes as a hallmark of the mitochondrial phenotype of adipogenic differentiated human MSCs. *PLoS One* 7:e35160.
301. Hsp60 Struktur. <http://hsp60.com/structure/> (Stand: 29.12.2015).
302. Zalk R., Israelson A., Garty E.S., *et al.* (2005) Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 386:73-83.
303. Malia T.J. and Wagner G. (2007) NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL. *Biochemistry* 46:514-525.
304. Kovarova N., Mracek T., Nuskova H., *et al.* (2013) High molecular weight forms of mammalian respiratory chain complex II. *PLoS One* 8:e71869.
305. Gomez L.A., Monette J.S., Chavez J.D., *et al.* (2009) Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart. *Arch Biochem Biophys* 490:30-35.
306. NDUS1. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q66HF1> (Stand: 18.02.2016).
307. NDUA9. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q5BK63> (Stand: 18.02.2016).
308. QCR2. <http://www.uniprot.org/uniprot/P32551> (Stand: 18.02.2016).
309. Berg J.M., Tymoczko J.L. and Stryer L. (2003) Biochemie, 5. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg.
310. CISY. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8VHF5> (Stand: 18.02.2016).
311. Kratochwil M. (2015) Effects of ageing, calorie restriction and ageing-associated diseases on the mitochondrial proteome. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
312. ACON. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9ER34> (Stand: 18.02.2016).
313. 2-Oxoglutarat-DH-Komplex. <http://enzyme.expasy.org/EC/1.2.4.2> (Stand: 18.02.2016).
314. FUMH. <http://www.uniprot.org/uniprot/P14408> (Stand: 18.02.2016).
315. MDHM. <http://www.uniprot.org/uniprot/P04636> (Stand: 18.02.2016).
316. Hsp60. <http://www.uniprot.org/uniprot/P10809> (Stand: 18.02.2016).
317. LPPRC. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q5SGE0> (Stand: 18.02.2016).
318. GLYM. <http://www.uniprot.org/uniprot/P34897> (Stand: 18.02.2016).
319. NNTM. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q13423> (Stand: 18.02.2016).
320. OAT. <http://www.uniprot.org/uniprot/P04181> (Stand: 18.02.2016).
321. PDI. <http://www.uniprot.org/uniprot/P04785> (Stand: 18.02.2016).
322. PDIA3. <http://www.uniprot.org/uniprot/P11598> (Stand: 18.02.2016).
323. PDIA4. <http://www.uniprot.org/uniprot/P38659> (Stand: 18.02.2016).
324. PDIA6. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q63081> (Stand: 18.02.2016).
325. ENPL. <http://www.uniprot.org/uniprot/P14625> (Stand: 22.02.2016).
326. GRP48. <http://www.uniprot.org/uniprot/P11021> (Stand: 19.02.2016).
327. HYOU1. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q63617> (Stand: 18.02.2016).
328. CALX. <http://dict.leo.org/ende/?lang=de&from=fxdesktop&search=retention> (Stand: 19.02.2016).
329. CALR. <http://www.uniprot.org/uniprot/P27797> (Stand: 19.02.2016).
330. RPN1. <http://www.uniprot.org/uniprot/P04843> (Stand: 19.02.2016).

331. OST48. <http://www.uniprot.org/uniprot/P39656> (Stand: 19.02.2016).
332. STT3A. <http://www.uniprot.org/uniprot/P46977> (Stand: 19.02.2016).
333. Chen B., Piel W.H., Gui L., *et al.* (2005) The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86:627-637.
334. HS90B. <http://www.uniprot.org/uniprot/P08238> (Stand: 19.02.2016).
335. HS90A. <http://www.uniprot.org/uniprot/P07900> (Stand: 19.02.2016).
336. TRAP1. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q12931> (Stand: 19.02.2016).
337. KPYM. <http://www.uniprot.org/uniprot/P14618> (Stand: 19.02.2016).
338. TCPB. <http://www.uniprot.org/uniprot/P78371> (Stand: 19.02.2016).
339. TCPQ. <http://www.uniprot.org/uniprot/P50990> (Stand: 19.02.2016).
340. TCPA. <http://www.uniprot.org/uniprot/P28480> (Stand: 19.02.2016).
341. Hinman J.D., Chen C.D., Oh S.Y., *et al.* (2008) Age-dependent accumulation of ubiquitinated 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in myelin lipid rafts. *Glia* 56:118-133.
342. Kasama-Yoshida H., Tohyama Y., Kurihara T., *et al.* (1997) A comparative study of 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase in vertebrates: cDNA cloning and amino acid sequences for chicken and bullfrog enzymes. *J Neurochem* 69:1335-1342.
343. CN37. <http://www.uniprot.org/uniprot/P13233> (Stand: 19.02.2016).
344. ARP3. <http://www.uniprot.org/uniprot/P61158> (Stand: 19.02.2016).
345. ARP2. <http://www.uniprot.org/uniprot/P61160> (Stand: 19.02.2016).
346. WDR1. <http://www.uniprot.org/uniprot/O75083> (Stand: 19.02.2016).
347. ANXA2. https://en.wikipedia.org/wiki/Annexin_A2 (Stand: 19.02.2016).
348. Scheffler N.K., Miller S.W., Carroll A.K., *et al.* (2001) Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometric identification of mitochondrial proteins from an SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Mitochondrion* 1:161-179.
349. Wittig I., Braun H.P. and Schagger H. (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1:418-428.
350. Dani D. and Dencher N.A. (2008) Native-DIGE: a new look at the mitochondrial membrane proteome. *Biotechnol J* 3:817-822.
351. Hunzinger C., Wozny W., Schwall G.P., *et al.* (2006) Comparative profiling of the mammalian mitochondrial proteome: multiple aconitase-2 isoforms including N-formylkynurenine modifications as part of a protein biomarker signature for reactive oxidative species. *J Proteome Res* 5:625-633.
352. Groebe K., Krause F., Kunstmann B., *et al.* (2007) Differential proteomic profiling of mitochondria from *Podospora anserina*, rat and human reveals distinct patterns of age-related oxidative changes. *Exp Gerontol* 42:887-898.
353. Rexroth S., Meyer zu Tittingdorf J.M., Krause F., *et al.* (2003) Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis* 24:2814-2823.
354. NDUV2. <http://www.uniprot.org/uniprot/P19404> (Stand: 21.02.2016).
355. WB mit OxPhos Proteinen. http://www.abcam.com/total-oxphos-rodent-wb-antibody-cocktail-ab110413.html#description_images_1 (Stand: 29.02.2016).
356. Hu X., Crick S.L., Bu G., *et al.* (2009) Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20324-20329.
357. Li W., Tang Y., Fan Z., *et al.* (2013) Autophagy is involved in oligodendroglial precursor-mediated clearance of amyloid peptide. *Mol Neurodegener* 8:27.
358. Zheng L., Calvo-Garrido J., Hallbeck M., *et al.* (2013) Intracellular localization of amyloid-beta peptide in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Alzheimers Dis* 37:713-733.
359. He Y., Cui J., Lee J.C., *et al.* (2011) Prolonged exposure of cortical neurons to oligomeric amyloid-beta impairs NMDA receptor function via NADPH oxidase-mediated ROS production: protective effect of green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate. *ASN Neuro* 3:e00050.
360. Law A., Gauthier S. and Quirion R. (2001) Neuroprotective and neurorescuing effects of isoform-specific nitric oxide synthase inhibitors, nitric oxide scavenger, and antioxidant against beta-amyloid toxicity. *Br J Pharmacol* 133:1114-1124.
361. Celsi F., Ferri A., Casciati A., *et al.* (2004) Overexpression of superoxide dismutase 1 protects against beta-amyloid peptide toxicity: effect of estrogen and copper chelators. *Neurochem Int* 44:25-33.
362. Zhang L., Yu H., Zhao X., *et al.* (2010) Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 57:547-555.

363. Zhang W., Miao J., Hao J., *et al.* (2009) Protective effect of S14G-humanin against beta-amyloid induced LTP inhibition in mouse hippocampal slices. *Peptides* 30:1197-1202.
364. Wang H.Q., Sun X.B., Xu Y.X., *et al.* (2010) Astaxanthin upregulates heme oxygenase-1 expression through ERK1/2 pathway and its protective effect against beta-amyloid-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Brain Res* 1360:159-167.
365. Wang K., Zhu L., Zhu X., *et al.* (2014) Protective effect of paeoniflorin on Abeta25-35-induced SH-SY5Y cell injury by preventing mitochondrial dysfunction. *Cell Mol Neurobiol* 34:227-234.
366. Martire S., Fusco A., Rotili D., *et al.* (2013) PARP-1 modulates amyloid beta peptide-induced neuronal damage. *PLoS One* 8:e72169.
367. Giunta S., Andriolo V. and Castorina A. (2014) Dual blockade of the A1 and A2A adenosine receptor prevents amyloid beta toxicity in neuroblastoma cells exposed to aluminum chloride. *Int J Biochem Cell Biol* 54:122-136.
368. Liang J.H., Du J., Xu L.D., *et al.* (2009) Catalpol protects primary cultured cortical neurons induced by Abeta(1-42) through a mitochondrial-dependent caspase pathway. *Neurochem Int* 55:741-746.
369. Tsai S.J., Liu W.H. and Yin M.C. (2012) Trans fatty acids enhanced beta-amyloid induced oxidative stress in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *Neurochem Res* 37:786-794.
370. Guo K., Li L., Yin G., *et al.* (2015) Bag5 protects neuronal cells from amyloid beta-induced cell death. *J Mol Neurosci* 55:815-820.
371. Sheng B., Gong K., Niu Y., *et al.* (2009) Inhibition of gamma-secretase activity reduces Abeta production, reduces oxidative stress, increases mitochondrial activity and leads to reduced vulnerability to apoptosis: Implications for the treatment of Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 46:1362-1375.
372. Zhao F.L., Qiao P.F., Yan N., *et al.* (2015) Hydrogen Sulfide Selectively Inhibits gamma-Secretase Activity and Decreases Mitochondrial Abeta Production in Neurons from APP/PS1 Transgenic Mice. *Neurochem Res*.
373. Rampersad S.N. (2012) Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* 12:12347-12360.
374. Stepczynska A., Lauber K., Engels I.H., *et al.* (2001) Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene* 20:1193-1202.
375. Belmokhtar C.A., Hillion J. and Segal-Bendirdjian E. (2001) Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 20:3354-3362.
376. He N., Jin W.L., Lok K.H., *et al.* (2013) Amyloid-beta(1-42) oligomer accelerates senescence in adult hippocampal neural stem/progenitor cells via formylpeptide receptor 2. *Cell Death Dis* 4:e924.
377. Kaufmann S.H., Lee S.H., Meng X.W., *et al.* (2008) Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods* 44:262-272.
378. Pozarowski P., Halicka D.H. and Darzynkiewicz Z. (2003) Cell cycle effects and caspase-dependent and independent death of HL-60 and Jurkat cells treated with the inhibitor of NF-kappaB parthenolide. *Cell Cycle* 2:377-383.
379. Shi C., Zhao L., Zhu B., *et al.* (2009) Protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against beta-amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Chem Biol Interact* 181:115-123.
380. Kottke T.J., Blajeski A.L., Meng X.W., *et al.* (2002) Lack of correlation between caspase activation and caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 277:804-815.
381. Hill M.M., Adrain C., Duriez P.J., *et al.* (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* 23:2134-2145.
382. Li R.C., Pouranfar F., Lee S.K., *et al.* (2008) Neuroglobin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced cell injury. *Neurobiol Aging* 29:1815-1822.
383. Talanian R.V., Quinlan C., Trautz S., *et al.* (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 272:9677-9682.
384. Kaufmann S.H., Kottke T.J., Martins L.M., *et al.* (2001) Analysis of caspase activation during apoptosis. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 18:Unit 18 12.
385. Fernandes-Alnemri T., Armstrong R.C., Krebs J., *et al.* (1996) In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7464-7469.
386. Fernandes-Alnemri T., Litwack G. and Alnemri E.S. (1995) Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/Ice cysteine protease gene family. *Cancer Res* 55:2737-2742.

387. Srinivasula S.M., Fernandes-Alnemri T., Zangrilli J., *et al.* (1996) The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem* 271:27099-27106.
388. Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., *et al.* (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85:803-815.
389. Hu S., Snipas S.J., Vincenz C., *et al.* (1998) Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* 273:29648-29653.
390. Faubion W.A., Guicciardi M.E., Miyoshi H., *et al.* (1999) Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 103:137-145.
391. Kisselev A.F., Garcia-Calvo M., Overkleeft H.S., *et al.* (2003) The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem* 278:35869-35877.
392. Kobayashi T., Shinozaki A., Momoi T., *et al.* (1996) Identification of an interleukin-1 beta converting enzyme-like activity that increases upon treatment of P19 cells with retinoic acid as the proteasome. *J Biochem* 120:699-704.
393. Martin S.J., Finucane D.M., Amarante-Mendes G.P., *et al.* (1996) Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 271:28753-28756.
394. Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., *et al.* (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
395. Jang J.H., Kim C.Y., Lim S.H., *et al.* (2010) Neuroprotective effects of *Triticum aestivum* L. against beta-amyloid-induced cell death and memory impairments. *Phytother Res* 24:76-84.
396. Wang H., Xu Y., Yan J., *et al.* (2009) Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced cell injury. *Brain Res* 1283:139-147.
397. Iuvone T., Esposito G., Esposito R., *et al.* (2004) Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* 89:134-141.
398. Pannaccione A., Secondo A., Scorziello A., *et al.* (2005) Nuclear factor-kappaB activation by reactive oxygen species mediates voltage-gated K⁺ current enhancement by neurotoxic beta-amyloid peptides in nerve growth factor-differentiated PC-12 cells and hippocampal neurones. *J Neurochem* 94:572-586.
399. Fu Q., Gao N., Yu J., *et al.* (2014) Diazoxide pretreatment prevents Abeta1-42 induced oxidative stress in cholinergic neurons via alleviating NOX2 expression. *Neurochem Res* 39:1313-1321.
400. Mastroni D., Khodour O.M., Arce P.M., *et al.* (2015) Novel antioxidants protect mitochondria from the effects of oligomeric amyloid beta and contribute to the maintenance of epigenome function. *ACS Chem Neurosci* 6:588-598.
401. Xing S., Shen D., Chen C., *et al.* (2014) Early induction of oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease with heme oxygenase activity. *Mol Med Rep* 10:599-604.
402. Zhao H., Joseph J., Fales H.M., *et al.* (2005) Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5727-5732.
403. Zhao H., Kalivendi S., Zhang H., *et al.* (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 34:1359-1368.
404. Yatin S.M., Varadarajan S., Link C.D., *et al.* (1999) In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). *Neurobiol Aging* 20:325-330; discussion 339-342.
405. Boyd-Kimball D., Castegna A., Sultana R., *et al.* (2005) Proteomic identification of proteins oxidized by Abeta(1-42) in synaptosomes: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res* 1044:206-215.
406. Qi X.L., Xiu J., Shan K.R., *et al.* (2005) Oxidative stress induced by beta-amyloid peptide(1-42) is involved in the altered composition of cellular membrane lipids and the decreased expression of nicotinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 46:613-621.
407. Cecarini V., Gee J., Fioretti E., *et al.* (2007) Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1773:93-104.
408. Petermann V. (2015) Analyse von Atmungskettenkomplexen und Membranen von Säugetiermitochondrien sowie der Lipidperoxidation. Master Thesis, Technische Universität Darmstadt.
409. Pryor W.A. (1989) On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Radic Biol Med* 7:177-178.

410. Esterbauer H., Schaur R.J. and Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81-128.
411. Bozner P., Grishko V., LeDoux S.P., *et al.* (1997) The amyloid beta protein induces oxidative damage of mitochondrial DNA. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:1356-1362.
412. Forestier A., Douki T., Sauvaigo S., *et al.* (2012) Alzheimer's disease-associated neurotoxic peptide amyloid-beta impairs base excision repair in human neuroblastoma cells. *Int J Mol Sci* 13:14766-14787.
413. Muschol M. (2014) Analyse der Enzymaktivitäten von OxPhos-Komplexen / Superkomplexen und Veränderungen des mitochondrialen Proteoms in Bezug auf Alter und Kalorienrestriktion. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
414. Thilmany S.C. (2013) Das mitochondriale Proteom von *Rattus norvegicus* in Abhängigkeit von Alter und Kalorienrestriktion. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
415. Kuter K., Kratochwil M., Berghauzen-Maciejewska K., *et al.* (2016) Adaptation within mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and membrane viscosity during degeneration of dopaminergic neurons in an animal model of early Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1862:741-753.
416. Bobba A., Amadoro G., Valenti D., *et al.* (2013) Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by beta-amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion* 13:298-311.
417. Aleardi A.M., Benard G., Augereau O., *et al.* (2005) Gradual alteration of mitochondrial structure and function by beta-amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr* 37:207-225.
418. Parker W.D., Jr., Parks J., Filley C.M., *et al.* (1994) Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology* 44:1090-1096.
419. Rhein V., Baysang G., Rao S., *et al.* (2009) Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 29:1063-1071.
420. Casley C.S., Canevari L., Land J.M., *et al.* (2002) Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem* 80:91-100.
421. Canevari L., Clark J.B. and Bates T.E. (1999) beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett* 457:131-134.
422. Millucci L., Ghezzi L., Bernardini G., *et al.* (2010) Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr Protein Pept Sci* 11:54-67.
423. Chretien D., Slama A., Briere J.J., *et al.* (2004) Revisiting pitfalls, problems and tentative solutions for assaying mitochondrial respiratory chain complex III in human samples. *Curr Med Chem* 11:233-239.
424. Benit P., Goncalves S., Philippe Dassa E., *et al.* (2006) Three spectrophotometric assays for the measurement of the five respiratory chain complexes in minuscule biological samples. *Clin Chim Acta* 374:81-86.
425. Bothe S. (2015) Effects of oxygen and X-ray radiation on physiology and mitochondrial function of mammalian cells. Master Thesis, Technische Universität Darmstadt.
426. Cadenas E., Boveris A., Ragan C.I., *et al.* (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180:248-257.
427. Crouch P.J., Blake R., Duce J.A., *et al.* (2005) Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42. *J Neurosci* 25:672-679.
428. Ye X., Tai W., Bao X., *et al.* (2014) FLZ inhibited gamma-secretase selectively and decreased Abeta mitochondrial production in APP-SH-SY5Y cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 387:75-85.
429. Keil U., Bonert A., Marques C.A., *et al.* (2004) Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem* 279:50310-50320.
430. Kish S.J., Bergeron C., Rajput A., *et al.* (1992) Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 59:776-779.
431. Simonian N.A. and Hyman B.T. (1993) Functional alterations in Alzheimer's disease: diminution of cytochrome oxidase in the hippocampal formation. *J Neuropathol Exp Neurol* 52:580-585.
432. David D.C., Hauptmann S., Scherping I., *et al.* (2005) Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J Biol Chem* 280:23802-23814.
433. Krause F. (2004) Biochemische Charakterisierung der supramolekularen Organisation der mitochondrialen OXPHOS-Komplexe von Säugern, Pilzen und Pflanzen. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.

434. Krause F., Reifschneider N.H., Goto S., *et al.* (2005) Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 329:583-590.
435. Suhai T., Heidrich N.G., Dencher N.A., *et al.* (2009) Highly sensitive detection of ATPase activity in native gels. *Electrophoresis* 30:3622-3625.
436. van Lis R., Mendoza-Hernandez G., Groth G., *et al.* (2007) New insights into the unique structure of the F0F1-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 144:1190-1199.
437. Poetsch A., Neff D., Seelert H., *et al.* (2000) Dye removal, catalytic activity and 2D crystallization of chloroplast H(+)-ATP synthase purified by blue native electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1466:339-349.
438. Perelman A., Wachtel C., Cohen M., *et al.* (2012) JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis* 3:e430.
439. Jang J.H. and Surh Y.J. (2003) Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med* 34:1100-1110.
440. Sugawa M., Coper H., Schulze G., *et al.* (1996) Impaired plasticity of neurons in aging. Biochemical, biophysical, and behavioral studies. *Ann N Y Acad Sci* 786:274-282.
441. Lentz B.R. (1993) Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chem Phys Lipids* 64:99-116.
442. Daum G. (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 822:1-42.
443. Angelini R., Babudri F., Lobasso S., *et al.* (2010) MALDI-TOF/MS analysis of archaeobacterial lipids in lyophilized membranes dry-mixed with 9-aminoacridine. *J Lipid Res* 51:2818-2825.
444. Angelini R., Vitale R., Patil V.A., *et al.* (2012) Lipidomics of intact mitochondria by MALDI-TOF/MS. *J Lipid Res* 53:1417-1425.
445. Monteiro-Cardoso V.F., Oliveira M.M., Melo T., *et al.* (2015) Cardiolipin profile changes are associated to the early synaptic mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 43:1375-1392.
446. Chauhan A., Chauhan V.P.S., Brockerhoff H., *et al.* (1993) Effect of Amyloid Beta-Protein on Membrane Properties, *John Wiley*, New York (USA).
447. Hartmann H., Eckert A. and Muller W.E. (1994) Apolipoprotein E and cholesterol affect neuronal calcium signalling: the possible relationship to beta-amyloid neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1185-1192.
448. Muller W.E., Eckert G.P., Scheuer K., *et al.* (1998) Effects of beta-amyloid peptides on the fluidity of membranes from frontal and parietal lobes of human brain. High potencies of A beta 1-42 and A beta 1-43. *Amyloid* 5:10-15.
449. Muller W.E., Koch S., Eckert A., *et al.* (1995) beta-Amyloid peptide decreases membrane fluidity. *Brain Res* 674:133-136.
450. Eckert G.P., Cairns N.J., Maras A., *et al.* (2000) Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 11:181-186.
451. Eckert G.P., Wood W.G. and Muller W.E. (2001) Effects of aging and beta-amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes. *J Neural Transm (Vienna)* 108:1051-1064.
452. Kremer J.J., Pallitto M.M., Sklansky D.J., *et al.* (2000) Correlation of beta-amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. *Biochemistry* 39:10309-10318.
453. Waschuk S.A., Elton E.A., Darabie A.A., *et al.* (2001) Cellular membrane composition defines A beta-lipid interactions. *J Biol Chem* 276:33561-33568.
454. Yip C.M., Elton E.A., Darabie A.A., *et al.* (2001) Cholesterol, a modulator of membrane-associated A beta-fibrillogenesis and neurotoxicity. *J Mol Biol* 311:723-734.
455. Mason R.P., Jacob R.F., Walter M.F., *et al.* (1999) Distribution and fluidizing action of soluble and aggregated amyloid beta-peptide in rat synaptic plasma membranes. *J Biol Chem* 274:18801-18807.
456. Avdulov N.A., Chochina S.V., Igbavboa U., *et al.* (1997) Amyloid beta-peptides increase annular and bulk fluidity and induce lipid peroxidation in brain synaptic plasma membranes. *J Neurochem* 68:2086-2091.
457. Chochina S.V., Avdulov N.A., Igbavboa U., *et al.* (2001) Amyloid beta-peptide1-40 increases neuronal membrane fluidity: role of cholesterol and brain region. *J Lipid Res* 42:1292-1297.
458. Peters I., Igbavboa U., Schutt T., *et al.* (2009) The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochim Biophys Acta* 1788:964-972.
459. Kojro E., Gimpl G., Lammich S., *et al.* (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5815-5820.

460. Yang X., Sheng W., Sun G.Y., *et al.* (2011) Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem Int* 58:321-329.
461. van Meer G., Voelker D.R. and Feigenson G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112-124.
462. Chou J.L., Shenoy D.V., Thomas N., *et al.* (2011) Early dysregulation of the mitochondrial proteome in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Proteomics* 74:466-479.
463. Unlu M., Morgan M.E. and Minden J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18:2071-2077.
464. Takano M., Yamashita T., Nagano K., *et al.* (2013) Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis. *Neurosci Lett* 534:85-89.
465. Diez R., Herbreith M., Osorio C., *et al.* (2010) 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (DIGE). Kapitel 4 in Neuroproteomics, Alzate O. *CRC Press/Taylor & Francis Group, LLC*, Boca Raton (USA).
466. Gillardon F., Rist W., Kussmaul L., *et al.* (2007) Proteomic and functional alterations in brain mitochondria from Tg2576 mice occur before amyloid plaque deposition. *Proteomics* 7:605-616.
467. Kazak L., Reyes A. and Holt I.J. (2012) Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:659-671.
468. Coskun P.E., Beal M.F. and Wallace D.C. (2004) Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10726-10731.
469. Krishnan K.J., Ratnaik T.E., De Gruyter H.L., *et al.* (2012) Mitochondrial DNA deletions cause the biochemical defect observed in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33:2210-2214.
470. Lin M.T., Simon D.K., Ahn C.H., *et al.* (2002) High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Genet* 11:133-145.
471. Elson J.L., Herrstadt C., Preston G., *et al.* (2006) Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease? *Hum Genet* 119:241-254.
472. Manczak M., Park B.S., Jung Y., *et al.* (2004) Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Neuromolecular Med* 5:147-162.
473. Reddy P.H., McWeeney S., Park B.S., *et al.* (2004) Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 13:1225-1240.
474. Brooks W.M., Lynch P.J., Ingle C.C., *et al.* (2007) Gene expression profiles of metabolic enzyme transcripts in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1127:127-135.
475. Bubber P., Haroutunian V., Fisch G., *et al.* (2005) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann Neurol* 57:695-703.
476. Mastrogiacoma F., Lindsay J.G., Bettendorff L., *et al.* (1996) Brain protein and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 39:592-598.
477. Gibson G.E., Sheu K.F. and Blass J.P. (1998) Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J Neural Transm (Vienna)* 105:855-870.
478. Rafique R., Schapira A.H. and Cooper J.M. (2001) Sensitivity of respiratory chain activities to lipid peroxidation: effect of vitamin E deficiency. *Biochem J* 357:887-892.
479. Marchetti P., Castedo M., Susin S.A., *et al.* (1996) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 184:1155-1160.
480. Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., *et al.* (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184:1331-1341.
481. Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., *et al.* (1996) Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 384:53-57.
482. Kagan B.L. (2012) Membrane pores in the pathogenesis of neurodegenerative disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 107:295-325.
483. Fry M. and Green D.E. (1981) Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* 256:1874-1880.
484. Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M., *et al.* (2002) Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* 286:135-141.

485. Drose S., Zwicker K. and Brandt U. (2002) Full recovery of the NADH:ubiquinone activity of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica* by the addition of phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1556:65-72.
486. Schwall C.T., Greenwood V.L. and Alder N.N. (2012) The stability and activity of respiratory Complex II is cardiolipin-dependent. *Biochim Biophys Acta* 1817:1588-1596.
487. Gomez B., Jr. and Robinson N.C. (1999) Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1. *Biochemistry* 38:9031-9038.
488. Lange C., Nett J.H., Trumpower B.L., *et al.* (2001) Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc1 complex structure. *EMBO J* 20:6591-6600.
489. Robinson N.C. (1993) Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr* 25:153-163.
490. Eble K.S., Coleman W.B., Hantgan R.R., *et al.* (1990) Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 265:19434-19440.
491. Acehan D., Malhotra A., Xu Y., *et al.* (2011) Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP synthase in mitochondria. *Biophys J* 100:2184-2192.
492. Pfeiffer K., Gohil V., Stuart R.A., *et al.* (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 278:52873-52880.
493. Schagger H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1555:154-159.
494. Wenz T., Hielscher R., Hellwig P., *et al.* (2009) Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc(1) complex catalysis and supercomplex formation. *Biochim Biophys Acta* 1787:609-616.
495. Zhang M., Mileykovskaya E. and Dowhan W. (2002) Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 277:43553-43556.
496. Paradies G., Paradies V., De Benedictis V., *et al.* (2014) Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1837:408-417.
497. Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M., *et al.* (2001) Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity via cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. *Mitochondrion* 1:151-159.
498. Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M., *et al.* (2000) The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett* 466:323-326.
499. Genova M.L., Baracca A., Biondi A., *et al.* (2008) Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochim Biophys Acta* 1777:740-746.
500. Moore K. and Roberts L.J., 2nd (1998) Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 28:659-671.
501. Del Rio D., Stewart A.J. and Pellegrini N. (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15:316-328.
502. Ayala A., Munoz M.F. and Arguelles S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014:360438.
503. Riahi Y., Cohen G., Shamni O., *et al.* (2010) Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E879-886.
504. Bayir H., Tyurin V.A., Tyurina Y.Y., *et al.* (2007) Selective early cardiolipin peroxidation after traumatic brain injury: an oxidative lipidomics analysis. *Ann Neurol* 62:154-169.
505. Yabuuchi H. and O'Brien J.S. (1968) Brain cardiolipin: isolation and fatty acid positions. *J Neurochem* 15:1383-1390.
506. Weydert C.J. and Cullen J.J. (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 5:51-66.
507. Birgersdotter A., Sandberg R. and Ernberg I. (2005) Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol* 15:405-412.
508. Weaver V.M., Petersen O.W., Wang F., *et al.* (1997) Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 137:231-245.
509. Bhadriraju K. and Chen C.S. (2002) Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discov Today* 7:612-620.

510. Shield K., Ackland M.L., Ahmed N., *et al.* (2009) Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol* 113:143-148.
511. Zietarska M., Maugard C.M., Filali-Mouhim A., *et al.* (2007) Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Mol Carcinog* 46:872-885.
512. Lee J., Cuddihy M.J. and Kotov N.A. (2008) Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* 14:61-86.
513. Justice B.A., Badr N.A. and Felder R.A. (2009) 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discov Today* 14:102-107.
514. Reininger-Mack A., Thielecke H. and Robitzki A.A. (2002) 3D-biohybrid systems: applications in drug screening. *Trends Biotechnol* 20:56-61.
515. Sun T., Jackson S., Haycock J.W., *et al.* (2006) Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J Biotechnol* 122:372-381.
516. Fischer B. (2015) Long-Term 3D Cell Culture of SH-SY5Y Cells in Matrigel and Collagen. Protokoll zum Forschungspraktikum, Technische Universität Darmstadt.
517. Kim J.B. (2005) Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol* 15:365-377.
518. Khaitan D., Chandna S., Arya M.B., *et al.* (2006) Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *J Transl Med* 4:12.
519. Mehta G., Hsiao A.Y., Ingram M., *et al.* (2012) Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release* 164:192-204.
520. Ndubuizu O. and LaManna J.C. (2007) Brain tissue oxygen concentration measurements. *Antioxid Redox Signal* 9:1207-1219.
521. Villeneuve L., Tiede L.M., Morsey B., *et al.* (2013) Quantitative proteomics reveals oxygen-dependent changes in neuronal mitochondria affecting function and sensitivity to rotenone. *J Proteome Res* 12:4599-4606.
522. Picone P., Nuzzo D., Caruana L., *et al.* (2014) Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2014:780179.
523. Chua L.M., Lim M.L. and Wong B.S. (2013) The Kunitz-protease inhibitor domain in amyloid precursor protein reduces cellular mitochondrial enzymes expression and function. *Biochem Biophys Res Commun* 437:642-647.
524. Vektorkarte. http://www.evrogen.com/products/vectors/pmKate2-mito/pmKate2-mito_Locations.shtml (Stand: 03.11.2015).
525. FITC Struktur. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f7250?lang=de®ion=DE> (Stand: 24.10.2015).

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Weltweite Entwicklung (A) der Anzahl Demenzkranker und (B) der krankheitsbedingten Kosten.....	7
Abb. 2:	Geschätzte Zunahme der Krankenzahl in Deutschland von 2010 bis 2050.	8
Abb. 3:	Die von der Alzheimer Demenz betroffenen Hirnareale.....	10
Abb. 4:	(A) Amyloide Plaques aus amyloiden- β Peptiden und (B) Neurofibrillenbündel gebildet aus hyperphosphorylierten tau Proteinen.	11
Abb. 5:	Amyloidogene und nicht-amyloidogene Prozessierung des amyloiden Vorläuferproteins APP.....	12
Abb. 6:	Aminosäuresequenz von $A\beta_{1-42}$	14
Abb. 7:	Verschiedene $A\beta$ Spezies.	15
Abb. 8:	(A) Schematische und (B) elektronenmikroskopische Darstellung eines Mitochondrions.....	17
Abb. 9:	Prinzip der oxidativen Phosphorylierung.	18
Abb. 10:	Der elektrochemische Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran (IMM).....	19
Abb. 11:	Entstehung Reaktiver Sauerstoffspezies.	19
Abb. 12:	AlamarBlue® Test - Mechanismus der Reduktion von Resazurin in vitalen Zellen.	48
Abb. 13:	Prinzip der Apoptose- und Nekrosedetektion.	49
Abb. 14:	Mechanismus der Detektion von Wasserstoffperoxid.....	50
Abb. 15:	Mechanismus der Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) mittels JC-1.	50
Abb. 16:	Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.	52
Abb. 17:	Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM).....	54
Abb. 18:	Bradford Assay - (A) Struktur und (B) Absorptionsspektrum von Coomassie-Brilliantblau G250 (CBBG).	56
Abb. 19:	Prinzip der Lumineszenzreaktion für die ATP Bestimmung.	57
Abb. 20:	Struktur von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH).	58
Abb. 21:	Prinzip der Solubilisierung.....	59
Abb. 22:	Struktur des Steroid-Glykosids Digitonin.	60
Abb. 23:	Prinzip der blau-nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE).....	63
Abb. 24:	Prinzip der 2D-BN/SDS-PAGE.	65
Abb. 25:	Mechanismus der Präzipitatbildung beim in-Gel Aktivitätstest für Komplex I [269].	67
Abb. 26:	Mechanismus der Präzipitatbildung beim in-Gel Aktivitätstest für Komplex IV [270].	67
Abb. 27:	Quantitativer in-Gel Aktivitätstest für den OxPhos Komplex I (A-C) bzw. IV (D-F) am Beispiel BHM.....	70
Abb. 28:	Mechanismus der Präzipitatbildung beim in-Gel Hydrolyseaktivitätstest für Komplex V [270].	71
Abb. 29:	Mechanismus des in-Lösung Aktivitätstest für den OxPhos Komplex II.	73

Abb. 30:	(A) Oxidiertes und (B) reduziertes Cytochrom c (Cyt c) gelöst in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0).....	74
Abb. 31:	Mechanismus des in-Lösung Aktivitätstests für die Citrat-Synthase.	74
Abb. 32:	Western Blot - Immunochemische Detektion eines Proteins auf einer Transfermembran.	76
Abb. 33:	Western Blot - Blot-Zusammenbau nach dem <i>Semidry</i> Verfahren.	77
Abb. 34:	OxyBlot™ - Derivatisierung oxidativ modifizierter Proteine.	79
Abb. 35:	Quantitative Proteomanalyse mittels der Software Delta2D am Beispiel von BHM.	82
Abb. 36:	Wachstumskurve von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.	88
Abb. 37:	Zellmorphologie in Abhängigkeit von der Zelldichte.	90
Abb. 38:	Etablierung des optimalen Digitonin/Protein-Verhältnisses für die native Auftrennung von Mitochondrienproteinen aus OLN-93 (OLM) und SH-SY5Y (SHM) Zellen.	92
Abb. 39:	Identifikation von Atmungskettenproteinen nach Mitochondrienisolation aus Rinderherz (BHM) sowie OLN-93 (OLM) und SH-SY5Y (SHM) Zellen mittels (A-E) BN Western Blot und (F) in-Gel Komplex V Hydrolyseaktivitätstest.	94
Abb. 40:	Native Auftrennung von solubilisierten Mitochondrienproteinen mittels BN-PAGE.....	95
Abb. 41:	Identifikation von Mitochondrienproteinen aus (A+D) Rinderherz sowie (B+E) OLN-93 und (C+F) SH-SY5Y Zellen mittels 2D Western Blot.	98
Abb. 42:	Mittels PMF identifizierte Proteine aufgetrennt in einer 2D-BN/SDS-PAGE.	100
Abb. 43:	Verteilung der mittels PMF identifizierten Proteine aufgetrennt in einer 2D-BN/SDS-PAGE.....	111
Abb. 44:	Identifizierte Proteine aus (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y in 2D-Gelen durch PMF, Western Blot oder Vergleich mit Daten anderer Organismen.	113
Abb. 45:	Unterschiede in der Proteinmenge von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.....	117
Abb. 46:	Nachweis von Atmungskettenkomplexen in OLM und SHM im Western Blot am Beispiel der Komplex I Untereinheit Ndufs1.	118
Abb. 47:	Disaggregation von A β ₁₋₄₂ Peptiden mit Trifluoressigsäure resultierte in Mono- und Dimeren sowie niederen Oligomeren.	119
Abb. 48:	Interaktion von A β ₁₋₄₂ mit OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.....	120
Abb. 49:	Keine Kolokalisation von Mitochondrien und extern appliziertem A β ₁₋₄₂ nach 3 h.	121
Abb. 50:	Lokalisation von extern appliziertem A β ₁₋₄₂ Peptid in späten Endosomen nach 5 h.	122
Abb. 51:	Nachweis von extern appliziertem A β ₁₋₄₂ Peptid in den Mitochondrien von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.	122
Abb. 52:	Keine signifikante Änderung der Zellviabilität durch A β ₁₋₄₂	123
Abb. 53:	Keine signifikante A β ₁₋₄₂ -induzierte Wirkung auf die metabolische Aktivität von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.	124
Abb. 54:	Gleichbleibender Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen nach A β ₁₋₄₂ Behandlung.	126
Abb. 55:	Stark erhöhte zelluläre ROS Mengen durch A β ₁₋₄₂ in OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.	128
Abb. 56:	Nicht signifikante A β ₁₋₄₂ -induzierte Proteinoxidation.	131
Abb. 57:	Keine signifikanten Änderungen der Cytochrom c Oxidase Aktivität durch A β ₁₋₄₂ Behandlung in in-Gel CIV Aktivitätstests.....	135

Abb. 58:	Keine signifikanten Änderungen der NADH Dehydrogenase Aktivität durch A β ₁₋₄₂ Behandlung in in-Gel CI Aktivitätstests.	138
Abb. 59:	Geringe Änderungen der NADH Dehydrogenase Aktivität durch A β ₁₋₄₂ Behandlung in Aktivitätstests mit immobilisiertem Komplex I.	139
Abb. 60:	A β ₁₋₄₂ -vermittelte Abnahme der Aktivität von Komplex I.	141
Abb. 61:	A β ₁₋₄₂ -vermittelte Abnahme der Aktivität von Komplex II.	143
Abb. 62:	A β ₁₋₄₂ -vermittelte Zunahme der Komplex IV Aktivität.	145
Abb. 63:	Abnahme der ATP Konzentration durch A β ₁₋₄₂	148
Abb. 64:	Keine A β ₁₋₄₂ -induzierte Veränderung des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) bestimmbar aufgrund technischer Komplikationen.	150
Abb. 65:	Keine wesentlichen visuellen Unterschiede im mitochondrialen Membranpotenzial zwischen unbehandelten und A β ₁₋₄₂ -behandelten Zellen.	152
Abb. 66:	Verringerung des mitochondrialen Membranpotenzials durch A β ₁₋₄₂ in OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.	154
Abb. 67:	A β ₁₋₄₂ -induzierte Abnahme der Anisotropie von Mitochondrienmembranen in OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.	156
Abb. 68:	A β ₁₋₄₂ -induzierte Änderungen der Proteinmenge mitochondrialer Proteine von (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y Zellen.	160
Abb. 69:	A β ₁₋₄₂ -induzierte Änderungen der Proteinmenge von Proteinen des endoplasmatischen Reticulums in (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y Proben.	164
Abb. 70:	A β ₁₋₄₂ -induzierte Änderungen der Proteinmenge cytosolischer Proteine von (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y Zellen.	165
Abb. 71:	A β ₁₋₄₂ -induzierte Änderungen der Proteinmenge nicht identifizierter Proteine von (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y Zellen.	167
Abb. 72:	Signifikante A β ₁₋₄₂ -induzierte Änderungen von Proteinmengen in (A) OLN-93 und (B) SH-SY5Y Zellen.	169
Abb. 73:	Vergleich der Morphologie von SH-SY5Y Zellen in (A) 2D- und (B-D) 3D-Zellkultur. .	177

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Prävalenz von Demenzerkrankungen in Deutschland in Abhängigkeit vom Alter.	8
Tab. 2:	Jährliche Inzidenzwahrscheinlichkeit in Deutschland in Abhängigkeit vom Alter.	9
Tab. 3:	Plasmid für die stabile Transfektion von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.	45
Tab. 4:	Fluorophore für die Durchflusszytometrie.	53
Tab. 5:	Einstellungen am Plasmaofen Zepto Typ B zur Behandlung von Deckgläschen mit Sauerstoff-Plasma.	54
Tab. 6:	Fluorophore für die Konfokalmikroskopie.	54
Tab. 7:	Zusammensetzung 12%iger Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE nach Laemmli [255].	62
Tab. 8:	Zusammensetzung 18%iger Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE nach Schagger [256].	62
Tab. 9:	Zusammensetzung von Gradientengelen für die BN-PAGE.	64
Tab. 10:	Zusammensetzung 13%iger SDS-Gele für die SDS-PAGE in der 2. Dimension.	66
Tab. 11:	Molmassen der OxPhos Komplexe [276].	69
Tab. 12:	Messparameter für die spektrophotometrische Messung der in-Lösung Aktivität der OxPhos Komplexe I, II und IV sowie der Citrat-Synthase [237].	71
Tab. 13:	Inhibitoren der OxPhos Komplexe I, II und IV [237].	72
Tab. 14:	Extinktionskoeffizienten der umgesetzten Substrate für die Berechnung der in-Lösung Aktivität der OxPhos Komplexe I, II und IV sowie der Citrat-Synthase [237].	72
Tab. 15:	Reaktionspuffer für Komplex I in-Lösung Aktivitätstests [237].	73
Tab. 16:	Reaktionspuffer für Komplex II in-Lösung Aktivitätstests [237].	73
Tab. 17:	Reaktionspuffer für Komplex IV in-Lösung Aktivitätstests [237].	74
Tab. 18:	Reaktionspuffer für Citrat-Synthase in-Lösung Aktivitätstests [237].	75
Tab. 19:	Complex I Enzyme Activity Microplate Assay Kit - Zusammensetzung der Assay Lösung [280].	75
Tab. 20:	Primärantikörper für die Verwendung im Western Blot.	77
Tab. 21:	Sekundärantikörper für die Verwendung im Western Blot.	78
Tab. 22:	Einstellungen für MALDI-TOF/TOF MS Messungen.	84
Tab. 23:	Massen des externen Kalibrierungsstandards auf dem Probenhalter HCCA PAC II.	84
Tab. 24:	Suchparameter für den Peptidmassenfingeraabdruck.	85
Tab. 25:	P-Werte, ihre Bedeutung für die Signifikanz sowie die symbolische Kennzeichnung der p-Werte, wie sie in der vorliegenden Arbeit in Diagrammen zu finden ist.	85
Tab. 26:	Mittels PMF identifizierte Proteine aufgetrennt in einer 2D-BN/SDS-PAGE.	101
Tab. 27:	Zusätzlich identifizierte Proteine in 2D-Gelen durch den Vergleich mit BHM.	114
Tab. 28:	Signifikante Unterschiede in der Proteinmenge von OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.	116
Tab. 29:	Signifikante A β ₁₋₄₂ -induzierte Änderungen von Proteinmengen in OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.	168
Tab. 30:	Einfluss von A β ₁₋₄₂ Peptiden auf OLN-93 und SH-SY5Y Zellen.	173

8.4 Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Bedeutung	Abk.	Bedeutung
2D	zweidimensional	K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
2D-BN/SDS-PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese mit nativer Auftrennung in der 1. Dimension und denaturierender in der 2. Dimension	KCN	Kaliumcyanid
2-OH-E(+)	2-Hydroxyethidium	KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
3D	dreidimensional	KOH	Kaliumhydroxid
4-HNE	4-Hydroxynonenal	Konz.	Konzentration
4-IPBA	4-Iodophenylborsäure	KPYM	Pyruvate kinase PKM
A, Abs.	Absorption	Konz.	Konzentration
ACON	Aconitate hydratase	KPYM	Pyruvate kinase PKM
AD	Alzheimer Demenz	LC-MS/MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
ADAM	eine Disintegrin- und Metalloproteinase, <i>a desintegrin and metalloproteinase</i>	L-Gln	L-Glutamin
ADP	Adenosindiphosphat	LMW	Amersham™ LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis
AICD	APP intrazelluläre Domäne, <i>APP intracellular domain</i>	LPPRC	Leucine-rich PPR motif-containingprotein
AICD	APP intrazelluläre Domäne	LRL	Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder
ANXA2	Annexin A2	LRP1	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
APH1	<i>anterior pharynx-detective 1</i>	LTR	LysoTracker® Red DND-99
APP	amyloides Vorläuferprotein, <i>amyloid precursor protein</i>	m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
APP695	amyloides Vorläuferprotein mit 695 Aminosäuren (Isoform)	MAC	Apoptose-induzierender Kanal, mitochondrial
APP _{swe}	amyloides Vorläuferprotein mit der Schwedischen Mutation	MALDI	Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionisation
APS	Ammoniumpersulfat	MAM	<i>mitochondria-associated ER membranes</i>
ARP2	Actin-related protein 2	MDA	Malondialdehyd
ARP3	Actin-related protein 3	MDHM	Malate dehydrogenase
AS	Aminosäure	Mg ²⁺	Magnesiumion
AT5F1	ATP synthase subunit b	MilliQ-Wasser	Reinstwasser
AT5F1	ATP synthase F(0) complex subunit B1	MM	MagicMark™ XP Western ProteinStandard
ATP	Adenosintriphosphat	MMP	mitochondriales Membranpotenzial
ATPA	ATP synthase subunit alpha	MPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
ATPB	ATP synthase subunit beta	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, <i>messenger ribonucleic acid</i>
ATPG	ATP synthase subunit gamma	MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie
ATPO	ATP synthase subunit O	ms-α-ATPA	mouse-anti-OxPhos Complex V subunit alpha (CV)
Aβ	amyloides-β Peptid	ms-α-	Anti-ATPB antibody (CV)
Aβ _{11-x}	N-terminal verkürztes amyloides-β Peptid		
Aβ ₁₋₄₀	amyloides-β Peptid mit 40 Aminosäuren		
Aβ ₁₋₄₂	amyloides-β Peptid mit 42 Aminosäuren		
Aβ ₂₅₋₃₅	Fragment des amyloiden-β Peptids von Aminosäure 25 bis 35		

Abk.	Bedeutung	Abk.	Bedeutung
A β ₄₂₋₁	reverses A β ₁₋₄₂ Peptid	ATPB	
A β _{pE-42}	amyloides- β Peptid mit Pyroglutamat am N-terminus und AS 42 am C-terminus	ms- α -A β ₁₋₄₂	Mouse anti Human Amyloid beta 8G7
A β _{x-42}	amyloide- β Peptid Spezies mit AS 42 am C-terminus	ms- α -MTCO1	Anti-MTCO1 antibody (CIV)
BACE1	β -site APP cleaving enzyme 1	ms- α -SDHA	Anti-SDHA antibody (CII)
BACE2	β -site APP cleaving enzyme 2	ms- α -UQCRC2	Anti-UQCRC2 antibody (CIII)
BHM	Rinderherzmitochondrien, <i>bovine heart mitochondria</i>	MTCO1	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1
BN	blau-nativ	mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
BN-PAGE	blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese	MTR	MitoTracker® Red CM-H ₂ XRos
BSA	Albumin Fraktion V, <i>bovine serum albumin</i>	MTS	mitochondriale Zielsequenz, <i>mitochondrial targeting sequence</i>
C83	membranassoziiertes APP Fragment nach α -Sekretaseaktivität	MW	Molekülmasse
C99	membranassoziiertes APP Fragment nach β -Sekretaseaktivität	MW	Mittelwert
Ca ²⁺	Calciumion	N	biologisches Replikat
CALR	Calreticulin	n	technisches Replikat
CALX	Calnexin	N ₂	Stickstoff
CBBG	Coomassie-Brilliantblau G250	Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
CCCP	Carbonyl-cyanid-3-chlorophenylhydrazon	Na ₃ PO ₄ · 12 H ₂ O	Natriumphosphat-Dodecahydrat
CH60	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	NaCl	Natriumchlorid
CI	Komplex I, NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase	NAD ⁺	Nicotinamadenindinukleotid (oxidierte Form)
CII	Komplex II, Succinat-Dehydrogenase	NADH	Nicotinamadenindinukleotid (reduzierte Form)
CIII	Komplex III, Cytochrom-c-Oxidoreduktase	NADP ⁺	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
CISY	Citrate synthase	NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
CIV	Komplex IV, Cytochrom-c-Oxidase	NaOH	Natriumhydroxid
CLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	N-APP β	N-terminales APP Fragment, entsteht aus sAPP β
CMC	kritische mizellare Konzentration, <i>critical micelle concentration</i>	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
CN37	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	ND1-6	mitochondrial codierte Untereinheiten von Komplex I
CN-PAGE	klar-native (<i>clear-native</i>) Polyacrylamidgelelektrophorese	NDUA9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit
CoA	Coenzym A	NDUS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit
COX1	Cytochrome c oxidase subunit 1	NDUV2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2
COX2	Cytochrome c oxidase subunit 2	Nekr.+	positive für nekrotische Zellen
COX41	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1		
COX5A	Cytochrome c oxidase subunit 5A		

Abk.	Bedeutung	Abk.	Bedeutung
CS	Citrat-Synthase	NFTs	Neurofibrillenbündel, <i>neurofibrillary tangles</i>
CV	Komplex V, F ₁ F ₀ ATP Synthase	NK	Negativkontrolle
CY1	Cytochrome c1, CIII Untereinheit	NMDA	N-Metyl-D-Aspartat
CYB	Cytochrome b, mitochondrial codierte CIII Untereinheit	NNTM	NAD(P) transhydrogenase
Cyt c	Cytochrom c	NSPCs	Stamm-/Vorläufer-Zellen, <i>neural stem/progenitor cells</i>
D/P	Digitonin/Protein-Verhältnis	O ₂ ^{•-}	Superoxidradikalanion
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	O ₂	Sauerstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure	OAT	Ornithine aminotransferase
DCF	Dichlorfluorescein	ODO1	2-oxoglutarate dehydrogenase
DCPIP	2,6-Dichlorphenol-indophenol-natrium	ODO2	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex
DDZ	Deutsches Diabetes-Zentrum	OH [•]	Hydroxradikal
dest. VE-Wasser	destilliertes vollentsalztes Wasser	OLL	Zelllysate von OLN-93
DHE	Dihydroethidium	OLM	Mitochondrien aus OLN-93 Zellen
DIGE	<i>difference gel electrophoresis</i>	OMM	äußere Mitochondrienmembran
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	OST	N-Oligosaccharyltransferase
DMSO	Dimethylsulfoxid	OST48	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit
DNP	2,4-Dinitrophenylhydrazon	ox.	oxidiert
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin	OxPhos	oxidative Phosphorylierung
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>	p	p-Wert
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien	P/S	Penicillin-Streptomycin
DR6	Todesrezeptor 6, <i>death receptor 6</i>	P3	extrazelluläres APP Fragment nach proteolytischem Verdau von C83
dy-α-gt-HRP	donkey anti-goat IgG-HRP	PAC	<i>Prespotted AnchorChip</i>
dy-α-ms-HRP	donkey anti-mouse IgG-HRP	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
dy-α-rb-HRP	donkey anti-rabbit IgG-HRP	Pb ₃ (PO ₄) ₂	Bleiphosphat
e ⁻	Elektron	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
ECL	Chemilumiszenzreaktion, <i>enhanced chemiluminescence reaction</i>	PDIA1	Protein disulfide-isomerase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3
em	Emission	PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>	PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6
ENPL	Endoplasmin	pE	Pyroglutamat
ER	Endoplasmatisches Reticulum	pE-Aβ	amyloides-β Peptid mit Pyroglutamat am N-terminus
EtOH	Ethanol	PEN2	Presenilin Verstärker 2, presenilin enhancer 2
ex	Exzitation	P _i	Phosphat
f.Apop.+	positiv für frühapoptotische Zellen		
F12	<i>Ham's F-12 nutrient mixture</i>		
FAD	Alzheimer Demenz mit frühem Beginn, <i>familial Alzheimer's disease</i>		

Abk.	Bedeutung	Abk.	Bedeutung
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)	PI	Propidiumiodid
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)	PIC	Protease Inhibitor Cocktail
FBS	Fötales Rinderserum, <i>Fetal Bovine Serum</i>	PK	Positivkontrolle
FeII/FeIII	Eisenion (zwei-/dreiwertig)	PMF	Peptidmassenfingerabdruck, <i>peptide mass finger print</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	PMT	Photomultiplerröhre, <i>photo multiplier tube</i>
FITC-A β ₁₋₄₂	Fluoresceinisothiocyanat markiertes amyloides- β 1-42 Peptid	PR	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder
FL	Fluoreszenzkanal	PreP	<i>Presequence</i> Protease, mitochondrial
FMM	"Fluidität" der mitochondrialen Membran	PS	Phosphatylserin
FMN	Flavinmononukleotid	PS1	Presenilin 1
FSC	Vorwärtsstreulicht, <i>forward scatter</i>	PS2	Presenilin 2
FUMH	Fumarate hydratase	PVDF	Polyvinylidenfluorid
G418	Genticindisulfat, Neomycin	Q	Ubichinon
GLYM	Serine hydroxymethyltransferase	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	QH ₂	Ubichinol
GTP	Guanosintriphosphat	RAGE	<i>scavenger receptor for advanced glycation end products</i>
gt- α -VDAC1	VDAC1 (C-20) Antikörper	rb- α -Hsp60	Anti-Hsp60 antibody
H ⁺	Proton	rb- α -Ndufs1	Rabbit anti NDUF51 Polyclonal antibody (CI)
H ₂ DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat	red.	reduziert
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
HCCA	α -Cyano-4-Hydroxymizsäure	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1
HCl	Salzsäure	RT	Raumtemperatur
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	s.Apop.+	positiv für spätapoptotische Zellen
hMSCs	humane mesenchymale Stammzellen, <i>human mesenchymal stem cells</i>	sAPP α	extrazelluläres APP Fragment nach α -Sekretaseaktivität
HMW	Amersham™ HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis	sAPP β	extrazelluläres APP Fragment nach β -Sekretaseaktivität
HO ₂ [•]	Hydroperoxylradikal	SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horse radish peroxidase</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
HS90B	Heat shock protein HSP 90-beta	SHM	Mitochondrien aus SH-SY5Y Zellen
Hsp60	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	SLL	Zelllysate von SH-SY5Y
HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1	SOD2	mitochondriale Superoxiddismutase
I ₁	individueller Komplex I	SSC	Seitwärtsstreulicht, <i>side scatter</i>
I ₁ III ₂	Superkomplex aus einer Kopie von CI und zwei Kopien von CIII	Stabw	Standardabweichung

Abk.	Bedeutung	Abk.	Bedeutung
I ₁ III ₂ IV ₀₋₃	Superkomplex aus einer Kopie von CI, zwei Kopien von CIII und null bis drei Kopien von CIV	STT3A	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A
I ₁ III ₂ IV ₁	Superkomplex aus einer Kopie von CI, zwei Kopien von CIII und einer Kopie von CIV	t	Zeit
I ₁ III ₂ IV ₁₋₃	Superkomplex aus einer Kopie von CI, zwei Kopien von CIII und ein bis drei von CIV	tagBFP-mito	blau fluoreszierendes Protein fusioniert mit der mitochondrialen Zielsequenz der humanen Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIII
I ₁ III ₂ IV ₂	Superkomplex aus einer Kopie von CI, zwei Kopien von CIII und zwei Kopien von CIV	TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
I ₁ III ₂ IV ₂₋₃	Superkomplex aus einer Kopie von CI, zwei Kopien von CIII und zwei bis drei Kopien von CIV	TCPA	T-complex protein 1 subunit alpha
I ₁ III ₂ IV ₃	Superkomplex aus einer Kopie von CI, zwei Kopien CIII und drei Kopien von CIV	TCPB	T-complex protein 1 subunit beta
I ₁ IV ₁	Superkomplex aus je einer Kopie von CI und CIV	TCPQ	T-complex protein 1 subunit theta
I ₁ IV ₂	Superkomplex aus einer Kopie von CI und zwei Kopien von CIV	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
IDE	Insulin-abbauendes Enzym, <i>insulin degrading enzyme</i>	TFA	Trifluoressigsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung	THF	Tetrahydrofuran
III ₂	Komplex III Dimer	TMA-DPH	1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien
III ₂ IV ₁	Superkomplex aus zwei Kopien von CIII und einer Kopie von CIV	TMD	Transmembrandomäne
III ₂ IV ₂	Superkomplex aus zwei Kopien von CIII und zwei Kopien von CIV	TMR	Tetramethylrhodamin
III ₂ IV _x	Superkomplex aus zwei Kopien von CIII und x Kopien von CIV	TNB	2-Nitro-5-thiobenzoat
III ₄	Komplex III Tetramer	TOF	Flugzeitanalysator, <i>time of flight</i>
Ile	Isoleucin	TOM	Translokase der äußeren Mitochondrienmembran, <i>translocase of the OMM</i>
IMM	innere Mitochondrienmembran	TRAP1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial
IV ₁	individueller Komplex IV	Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
IV ₂	Komplex IV Dimer	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
IV ₃	Komplex IV Trimer	ÜN	über Nacht
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-iodid	UQCRC2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2
		V ₁	Komplex V Monomer
		Val	Valin
		VDAC	mitochondriales Porin, <i>voltage-dependent anion channel</i>
		WDR1	WD repeat-containing protein 1
		α7 nAChR	α7 nikotinischer Acetylcholinrezeptor
		γCTF	cytosolisches γ-Sekretase C-terminales Fragment
		ΔΨ _m	mitochondriales Membranpotenzial
		λ	Wellenlänge

8.5 Einheitenverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent	min	Minute
% C	Quervernetzungsgrad	Mio.	Millionen
% T	Gesamtacrylamidkonzentration	mol	Mol
°C	Grad Celsius	mmol, nmol	Milli-, Nanomol
A	Ampere	Mrd.	Milliarden
mA	Milliampere	rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>revolutions per minute</i>
Da	Dalton	s	Sekunde
kDa, MDa	Kilo-, Megadalton	U	Einheit, <i>unit</i>
dpi	Punktdichte, <i>dots per inch</i>	V	absolutes Grauwertpixelvolumen
g	Gramm	V	Volt
mg, µg	Milli-, Mikrogramm	mV	Millivolt
h	Stunde	V%	relatives Grauwertpixelvolumen
Hz	Hertz	v/v	Volumenanteil, <i>volume per volume</i>
kHz	Kilohertz	W	Watt
l	Liter	mW	Milliwatt
ml, µl	Milli-, Mikroliter	w/v	Massenkonzentration, <i>weight per volume</i>
m	Meter	x g	x-faches der Erdbeschleunigung
cm, mm, nm	Zenti-, Milli-, Nanometer		
M	Molar		
mM, µM, nM	Milli-, Mikro-, Nanomolar		

9 Danksagung

Mein Dank geht an:

- Prof. Dr. Norbert A. Dencher für die Bereitstellung eines interessanten Forschungsthemas, die Unterstützung und die anregenden Diskussionen.
- PD. Dr. Tobias Meckel für die Übernahme des Koreferats sowie die vielen Stunden, die wir gemeinsam am SMD oder CLSM verbracht haben und die anregenden Diskussionen.
- Prof. Dr. Gerd Buntkowsky und Prof. Dr. Bodo Laube, die sich freundlicherweise als Fachprüfer zur Verfügung gestellt haben.
- Dr. Julian Hellmann-Regen von der Universitätsmedizin in Berlin für die Überlassung der SH-SY5Y Zellen.
- Dr. Lidija Cavlovic für die Auffrischung meiner Zellkulturkenntnisse und die gute Zusammenarbeit in unserem Zellkulturlabor sowie Dr. Manuela Kratochwil für die Einführung in 2D-BN/SDS-PAGE und Delta2D. Darüber hinaus für die tolle Zeit im "Frauenzimmer".
- Dipl.-Chem. Sven Marx, M. Sc. Tamara Dzinic sowie Dr. Katarzyna Kuter für interessante Diskussionen.
- B. Sc. Stefanie Eckes, B. Sc. Victoria Engemann und M. Sc. Elisabeth Krämer und M. Sc. Meral Azakli. Die Betreuung eurer Bachelor- bzw. Masterarbeiten hat mir Spaß gemacht.
- B. Sc. Stefanie Eckes, B. Sc. Victoria Engemann und M. Sc. Elisabeth Krämer für die Western Blots im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten bzw. Vertiefungspraktika.
- M. Sc. Stefanie Kern für die Anisotropiemessungen im Rahmen ihrer Masterarbeit.
- M. Sc. Stefanie Ascher (geb. Kemski) und M. Sc. Olga Ankudin für die vielen Stunden, die sie als HiWi am Photometer verbracht haben.
- Christine Schröpfer für Bestellungen von Laborbedarf und Chemikalien.
- Sabine Reinhold für die Unterstützung bei administrativen Tätigkeiten.
- Alle sonstigen (zeitweiligen) Mitglieder der AG Dencher, die mich während meiner Promotion begleitet haben, vor allem für die entspannenden Eispausen auf dem Fluchtbalkon.
- Simone Bartl-Zimmermann für die netten Gespräche, die die Aufsicht im Grundpraktikum Biochemie wie im Fluge haben vergehen lassen.
- AG Schmitz für die Erlaubnis den Mikroplattenleser benutzen zu dürfen.
- Dipl.-Chem. Marina Jöst und M. Sc. Ina Rink von der AG Schmitz für Diskussionen, ablenkende Gespräche und Eis.
- GRK 1657 für die Erlaubnis den S3™ Cell Sorter benutzen zu dürfen und Dipl.-Biol. Anne Ludwig für den Support an diesem Gerät.
- Dr. Stefan Lehr, Dr. Sonja Hartwig und weitere Mitarbeiter am DDZ in Düsseldorf für MS-Analysen und einen lehrreichen Rainbow Workshop.
- M. Sc. Laura Babel für die Überlassung der Bilder von SH-SY5Y Zellen in 3D-Kultur.
- Meine Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung, meine Großeltern für den bedingungslosen Glauben in meine Fähigkeiten und den Rest meiner Familie.
- Meine beste Freundin Dr. Clara Hoppenau für das allzeit offene Ohr.
- All meine Freunde und Bekannte für die notwendige Ablenkung, aber auch für das Verständnis, wenn mich das Labor von der notwendigen Ablenkung fernhielt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name **Victoria Decker**
Anschrift Lönsstr. 8
64291 Darmstadt
Telefon mobil 0151-59995540
E-Mail victoria_decker@web.de
Geburtsdatum/-ort 08.09.1985 in Dernbach
Nationalität deutsch



Ausbildung

03/2012 - heute

Promotionsstudentin und Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Norbert A. Dencher, Fachbereich Chemie, Technische Universität Darmstadt

- Forschungsthema: Beeinflussung von *Zellphysiologie und mitochondrialer Funktion durch Alzheimer Demenz-assoziiertes Amyloides- β Peptid*
- Lehrtätigkeit: Betreuung von Abschlussarbeiten (Bachelor und Master), Vertiefungspraktika und diverser Großpraktika, Leitung des Methodenseminars zum Grundpraktikum Biochemie, Tutor für die Übung zur Grundvorlesung Biochemie (inklusive Klausuraufsicht und -korrektur)

10/2006 - 10/2011

Studium der Biochemie mit Abschluss als Diplom-Biochemikerin Goethe Universität, Frankfurt

- Diplomarbeit bei PD Dr. Joachim Koch am Georg-Speyer Haus, Frankfurt: *Heterologe Expression von aktivierenden Rezeptoren natürlicher Killerzellen in Saccharomyces cerevisiae*
- Mündliche Diplomprüfungsfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie und Neurochemie
- Forschungspraktikum bei Prof. Dr. Alexander Gottschalk an der Goethe Universität, Frankfurt: *Isolierung synaptischer Vesikel aus dem Nematoden Caenorhabditis elegans*
- Forschungspraktikum bei PD Dr. Joachim Koch am Georg-Speyer Haus, Frankfurt: *Klonierung und Expression eines NKp30::Trypsinogen Fusionsproteins in COS7 Zellen zur Identifizierung neuer NKp30-Liganden*
- Forschungspraktikum bei Prof. Dr. Bernd Groner am Georg-Speyer Haus, Frankfurt: *Identifikation von Peptidaptameren zur Inhibition des Transkriptionsfaktors STAT3*
- Vordiplom in Biochemie, Biophysikalische Chemie, Organische Chemie und Tierphysiologie

04/2005 - 09/2006

Studium der Biomedizinischen Chemie (Diplom)
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
ohne Abschluss

09/1996 - 03/2005

Mons-Tabor-Gymnasium, Montabaur
Abitur mit den Prüfungsfächern Englisch, Chemie, Erdkunde, Biologie

Praktische Erfahrungen

11/2011 - 12/2011	Kommissioniererin (40 h/Woche) WEPA-Apothekenbedarf GmbH & Co KG, Hillscheid
01/2011 - 03/2011	Private Nachhilfelehrerin in Chemie für Mediziner
08/2004	Praktikum als Chemielaborantin Zschimmer & Schwarz GmbH & Co KG, Lahnstein
08/2001 - 12/2003	Servicekraft Eiscafé Elvis, Montabaur
10/2002 - 07/2003	Private Nachhilfelehrerin in Englisch

Sonstige Tätigkeiten

11/2013 - 09/2015	Beauftragte für die Biologische Sicherheit in der AG Dencher (mit Sachkundenachweis gem. §15 GenTSV)
05/2012 - 03/2016	Ersthelfer
Mitgliedschaften	GBM, SciMento, Mentorinnennetzwerk

Sprachkenntnisse

deutsch	Muttersprache
englisch	Fließend
französisch	Grundkenntnisse

EDV-Kenntnisse

MS Office	Word, Excel, PowerPoint	sehr gut
Literaturverwaltung	EndNote	sehr gut
Bildbearbeitung	ImageJ, GIMP 2	gut

Ehrenamtliche Tätigkeiten

01/2013 - 12/2013	Kassenwart des Sondershäuser Verbandes (einziger bundesweit organisierter Kulturverband für Studierende)
08/2009 - 09/2011	Flursprecher und -kassenwart im Studentenwohnheim Friedrich-Dessauer-Haus, Frankfurt
10/2007 - 03/2013	Diverse Vorstandsämter in der Frankfurter Niederlassung des Sondershäuser Verbandes (insgesamt fünf Semester 1. Vorsitzende, zwei Semester Schriftführer und drei Semester Kassenwart)
07/2001 - 01/2005	Betreuung der Messdiener der Kirchengemeinde Maria Geburt, Elgendorf

Interessen

Kochen, Theater, Reisen (bisher hauptsächlich in Deutschland)

Darmstadt, den 06.04.2016

Eidesstattliche Erklärungen

Victoria Decker
Lönsstr. 8
64291 Darmstadt

Darmstadt, den 06.04.2016

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Victoria Decker

Victoria Decker
Lönsstr. 8
64291 Darmstadt

Darmstadt, den 06.04.2016

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Victoria Decker